VERGLEICH ZWISCHEN KLASSISCHER UND FESTPHASEN-PEPTIDSYNTHESE AM BEISPIEL VON ACTH–TEILSEQUENZEN UNTER ANWENDUNG VON HOCHDRUCKFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Klaus Bürvenich
aus Oppeln

1979

VERGLEICH ZWISCHEN KLASSISCHER UND FESTPHASEN-PEPTIDSYNTHESE AM BEISPIEL VON ACTH–TEILSEQUENZEN UNTER ANWENDUNG VON HOCHDRUCKFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Klaus Bürvenich
aus Oppeln

1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 29. März 1979

Dekan:	Prof. Dr. M. Hanack
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. W. Voelter
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. E. Bayer

FÜR HELGA UND MUTZ

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536516_0002

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1973 bis Dezember 1978 am Institut für Organische Chemie, Professor Dr. E. Bayer, unter der Anleitung von Professor Dr. W. Voelter durchgeführt.

Herrn Professor Dr. W. Voelter danke ich für die vorbildliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. E. Bayer danke ich für die Bereitstellung der Institutseinrichtungen.

Herrn Dr. H. Bauer danke ich für die Einarbeitung in die HPLC-Trennung und die Unterstützung bei den Trennungen.

Herrn Hans Bartholomä danke ich für die Durchführung der FD-Spektren und Aminosäureanalysen.

Herrn H.-J. Wurmstich danke ich für die Durchführung der Elementaranalysen.

INHALTSVERZEICHNIS

A.	EINLEITUNG	1
B.	ALLGEMEINER TEIL	5
I.	Hormone	
1.	Definition	5
2.	Wirkungsweise	6
II.	Problematik der Peptidsynthese	8
1.	Kupplungsmethoden	10
2.	Schutzgruppen	12
3.	Synthesemöglichkeiten der Peptide	13
	α) klassische Synthese	13
	ß) Trägersynthesen	14
III.	Merrifield-Methode	16
1.	Trägermaterial	16
2.	Kupplung der ersten Aminosäure an den Träger	16
3.	Abspaltung der Schutzgruppen	16
4.	Abspaltung des Peptids vom Harz	17
IV.	Synthese der Merrifield-Sequenzen	17
1.	Sequenz 1 - 10	21
2.	Sequenz 1 - 4 und 6 - 10	21
V.	Klassische Synthesen	22
1.	Synthese von L-Ser-L-Tyr-L-Ser-L-Met-OH	22
2.	Synthese von L-His-L-Phe-L-Arg-L-Trp-Gly-OH	23
3.	Synthese von L-Ser-L-Tyr-L-Ser-L-Met-L-His-L-Phe-L-Arg-L-Trp-Gly-OH	25

VI. Spektroskopische Methoden 26

1. ^{13}C-NMR-Spektroskopie 26

1.1. Glycin und Derivate 27
1.2. Tryptophan und Derivate 29
1.3. Arginin und Derivate 32
1.4. Phenylalanin und Derivate 34
1.5. Histidin und Derivate 35
1.6. Glutaminsäure und Derivate 37
1.7. Methionin und Derivate 39
1.8. Serin und Derivate 41
1.9. Tyrosin und Derivate 43
1.10. Dipeptide 45

2. Ionenaustauschchromatographische Trennung der Syntheseprodukte und Charakterisierung der isolierten Produkte 49

a) Beschreibung des verwendeten Chromatographiesystems, Bauteile, Chemikalien und Reagenzien 52
α) Trennharz 52
ß) Elutionspuffer 52
γ) Ninhydrinreagens 52

b) Diskussion und Auswertung der erhaltenen Chromatogramme 53
α) Produkte der klassischen Synthesen 53
L-Arg-L-Trp-OH 53
L-Arg-L-Trp-Gly-OH 55
L-Phe-L-Arg-L-Trp-Gly-OH 57
L-Glu-L-His-L-Phe-L-Arg-L-Trp-Gly-OH 59
L-Ser-L-Tyr-L-Ser-L-Met-OH 61
L-His-L-Phe-L-Arg-L-Trp-Gly-OH 63
L-His-L-Phe-OH 65
L-Ser-L-Tyr-L-Ser-L-Met-L-Glu-L-His-L-Phe-L-Arg-L-Trp-Gly-OH 66

ß) Produkte nach der Merrifield-Methode 67
L-Ser-L-Tyr-L-Ser-L-Met-OH 68
L-His-L-Phe-L-Arg-L-Trp-Gly-OH 70
L-Glu-L-His-L-Phe-L-Arg-L-Trp-Gly-OH 71
L-Ser-L-Tyr-L-Ser-L-Met-L-Glu-L-His-L-Phe-L-Arg-L-Trp-Gly-OH 73

C. EXPERIMENTELLER TEIL 75

I. Allgemeine Arbeitsverfahren 75

1. Geräte 75
2. Lösungsmittel 76
3. Produkttrennung 76
4. Produktcharakterisierung 76
4.1. Aminosäureanalyse 76
4.2. Dünnschichtchromatographie 76
4.3. Trennsysteme 77
4.4. Anfärbereagenzien 77
4.5. Spektroskopische Methoden 77

II. Aminosäurederivate 78

1. Darstellung von Boc-Azid 78
2. Darstellung von Benzyloxycarbonylchlorid 78
3. Darstellung der Boc-Aminosäuren 79
3.1. Boc-L-Ser(Bzl)-OH 80
3.2. Boc-L-Tyr(Bzl)-OH 84
3.3. Boc-L-Met-OH 85
3.4. Boc-L-Glu(Bzl)-OH 87
3.5. Bis-Boc-L-His-OH 88
3.6. Boc-L-Phe-OH 90
3.7. Boc-L-Arg(NO_2)-OH 90
3.8. Boc-L-Trp-OH 92
3.9. Boc-Gly-OH 92

4.	Darstellung der Aminosäureester Z-L-Glu(OtBu)OCP und Z-Histidin-Azid	93
4.1.	L-Tyr(Bzl)-OMe . HCl	93
4.2.	L-Ser(Bzl)-OMe . HCl	93
4.3.	L-Met-OMe - HCl	94
4.4.	L-His-OMe . 2HCl	94
4.5.	L-Phe-OMe . HCl, L-Trp-OMe . HCl und Gly-OMe . HCl	95
4.6.	Z-L-Glu(OtBu)OCP	96
4.7.	Z-L-His-$NHNH_2$	101
4.8.	Z-L-His-N_3	101
III.	Darstellung der Peptidderivate nach der klassischen Methode	103
1.	L-Seryl-L-tyrosyl-L-seryl-L-methionin	103
2.	L-Histidyl-L-phenylalanyl-L-arginyl-L-tryptophanyl- glycin	108
3.	L-Seryl-L-tyrosyl-L-seryl-L-methionyl-L-glutaminyl-L-histidyl-L-arginyl-L-tryptophanyl- glycin	117
IV.	Darstellung der Peptide nach der Merrifield-Methode	118
1.	L-Seryl-L-tyrosyl-L-seryl-L-methionin	118
2.	L-Histidyl-L-phenylalanyl-L-arginyl-L-tryptophanyl- glycin	121
3.	L-Seryl-L-tyrosyl-L-seryl-L-methionyl-L-glutaminyl-L-histidyl-L-arginyl-L-tryptophanyl- glycin	123
D.	ZUSAMMENFASSUNG	126
E.	LITERATURVERZEICHNIS	127

In dieser Arbeit werden folgende Abkürzungen verwendet:

Aminosäuren:

Arg	= Arginin
Glu	= Glutaminsäure
Gly	= Glycin
His	= Histidin
Met	= Methionin
Phe	= Phenylalanin
Ser	= Serin
Trp	= Tryptophan
Tyr	= Tyrosin

AcOH	= Eisessig
ACTH	= Adrenocorticotropes Hormon
AS	= Aminosäure
Ä	= Diäthyläther
Boc-	= tert.-Butyloxycarbonyl-
CH_2Cl_2	= Methylenchlorid
DCCI	= N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DCHA	= Dicyclohexylammoniumsalz
DMF	= Dimethylformamid
EE	= Essigsäureäthylester
MeOH	= Methanol
MG	= Molekulargewicht
-OMe	= -Methylester
-OCP	= 2,4,5-Trichlorphenolester
PÄ	= Petroläther
PFT	= Puls-Fourier-Transformation
RH	= Releasing-Hormon
TÄA	= Triäthylamin
TFA	= Trifluoressigsäure
Z	= CBO - Benzyloxycarbonyl

A. EINLEITUNG

Das adrenocorticotrope Hormon (ACTH) ist ein Hormon des Hypophysenvorderlappens, dessen physiologische Wirkung auf einer Stimulierung der Nebennierenrinde beruht. Unter ACTH-Einfluß wird in der Nebennierenrinde die Produktion der Nebennierenrindenhormone gesteigert. Die ACTH-Sekretion und Neusynthese wird vom Zwischenhirn über das Neurosekret ("corticotropin-releasing hormone") gesteuert. Besonders unter "stress" wird vermehrt ACTH gebildet. Im Sinne einer Rückkopplung ("Feed-back-mechanism") wird die ACTH-Sekretion durch den erhöhten Corticosteroidspiegel gehemmt [1].

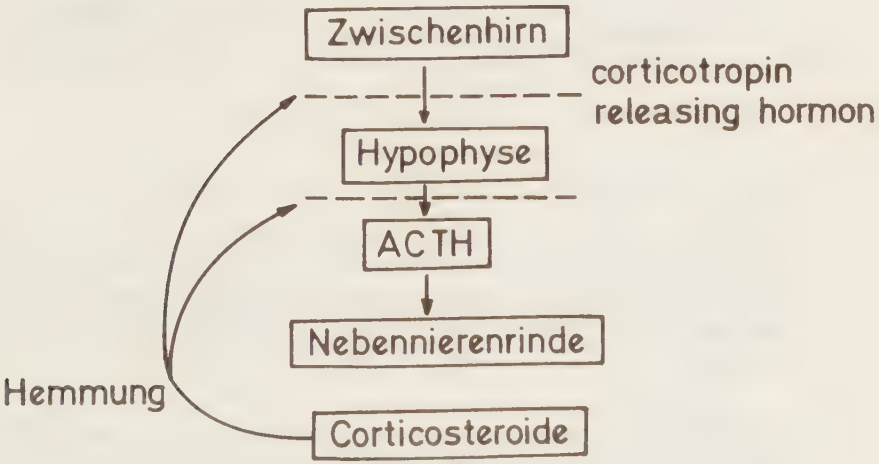
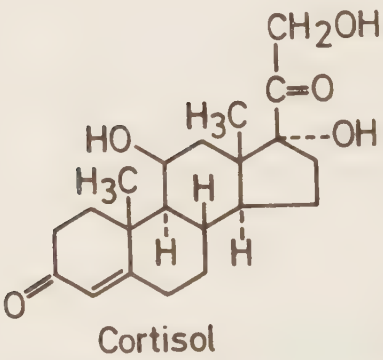
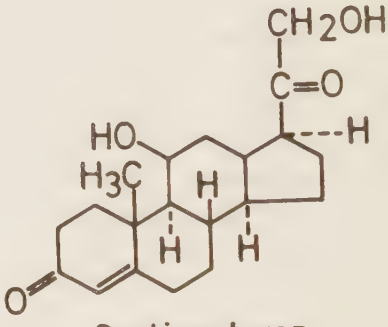


Abb. 1: Regelkreis der Hormonproduktion (Karlson 1970)

ACTH wird in den basophilen Zellen des Hypophysenvorderlappens gebildet und steuert die Synthese der Glucocorticoide Cortisol und Corticosteron. Die Sekretion von ATCH wird stimuliert durch den "corticotropin-releasing" Faktor, der im Zwischenhirn entsteht.



Cortisol



Corticosteron

Abb. 2: Struktur von Cortisol und Corticosteron

Die Struktur von ACTH ist aufgeklärt. 1954 veröffentlichten P.H. Bell und Mitarbeiter die vollständige Aminosäuresequenz von ACTH. Sie hatten es aus Schweinehypophysen isoliert [2].

H-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Val-Lys-Val-Tyr-Pro-Asn-Gly-Ala-Glu-Asp-Leu-Ala-Glu-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu-Phe-OH

Für die Wirkung auf die Nebennierenrinde ist nur eine Partialsequenz des ACTH-Moleküls, die Aminosäuren 1 - 16 verantwortlich [1] und hiervon speziell die Aminosäuren 6 - 10 (nach Geiger das aktive Zentrum [3]).

Alle anderen Aminosäurereste haben lediglich die Aufgabe, den aktiven Bereich in eine günstige Rezeptorlage zu bringen. Es ist wahrscheinlich, daß die genannte Pentapeptidsequenz H-His-Phe-Arg-Trp-Gly-OH auch für die Melanocyten-stimulierenden Hormone als aktives Zentrum fungiert [4].

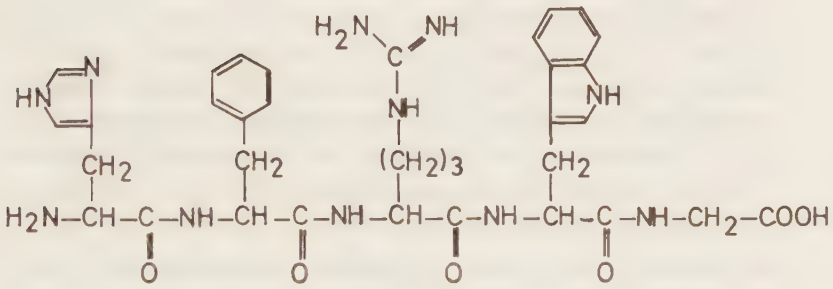


Abb. 3: Sequenz des freien Pentapeptids

Die Artspezifität des ACTH ist bedingt durch Unterschiede in der Aminosäuresequenz 25 - 33 [4].

Corticotropinsequenz	25	26	27	28	29	30	31	32	33
Mensch	Asn	Gly	Ala	Glu	Asp	Glu	Ser	Ala	Glu
Rind	Asp	Gly	Glu	Ala	Glu	Asp	Ser	Ala	Glu
Schaf	Ala	Gly	Glu	Asp	Asp	Glu	Ala	Ser	Glu
Schwein	Asn	Gly	Ala	Glu	Asp	Glu	Leu	Ala	Glu

Abb. 4: Artspezifität von ACTH

Seit 1956 wurden verschiedene Partialsequenzen synthetisch dargestellt, woran besonders die Arbeitskreise um Boissonas, Hofmann, Li und Schwyzer beteiligt waren.

Die Totalsynthese des ACTH mit Asp bzw. Gln in den Positionen 25 bzw. 33 wurde durch Schwyzer und Sieber 1963 abgeschlossen [5]. Zunächst wurde der C-terminale Teil, die Sequenz stufenweise unter Verwendung von N-Benzyloxycarbonyl-aminosäure-p-nitrophenylestern aufgebaut. Die α-Carboxylfunktionen wurden mit der tert.-Butylester-Gruppierung geschützt. Die Benzyloxycarbonylschutzgruppen wurden hydrogenolytisch abgespalten. Anschließend wurden die entsprechenden geschützten Fragmente, das N-Benzyloxycarbonyl-Lys(Boc)-ß-corticotropin(17-24)-octapeptidsulfat nach der Methode der gemischten Anhydride, das N-Benzyloxycarbonyl-Lys(Boc)-ß-corticotropin(11-16)-hexapeptidhydrazid mittels der Azidmethode und das N-tert.-Butyloxycarbonyl-Glu(OBut)-ß-corticotropin(1-10)-decapeptid nach dem DCCI-Verfahren, miteinander verknüpft.

1967 bauten Bajusz und Mitarbeiter das Human-ACTH [6] auf, 1972 wurde von P. Sieber, W. Rittel und B. Riniker die Synthese von menschlichem ACTH mit revidierter Aminosäuresequenz beschrieben [7].

In der folgenden Arbeit sollen Teilsequenzen von ACTH, synthetisiert nach der Festphasenmethode von Merrifield [8,9] und der klassischen Methode, unter Anwendung von Hochdruckflüssigkeitschromatographie miteinander verglichen werden.

B. ALLGEMEINER TEIL

I. Hormone [10]

1. Definition

Hormone sind Substanzen verschiedener organischer Stoffklassen. Sie sind Informationsüberträger, die von bestimmten Organen gebildet werden und über das Blut, den Liquor cerebrospinalis oder den Nervenweg an den Wirkungsort gelangen. Im Blut und Gewebe werden Hormone größtenteils abgebaut und inaktiviert. Sie werden meistens als Metabolite durch Harn, Galle und Stuhl ausgeschieden.
Alle Hormone greifen in Stoffwechselvorgänge ein. Sie sind ein wichtiger Teil im humoral-vegetativen System, das die Homöostase des Organismus aufrecht erhält, die Anpassung an Umweltreize sichert und der Arterhaltung dient.

Folgende Organe bilden die Hormone: Hypothalamus, Hypophyse, Schilddrüse, Zirbeldrüse, Nebennierenrinde, Nebennierenmark, Gonaden, Plazenta, Nebenschilddrüse, die Langerhans'schen Inselzellen des Pankreas und bestimmte Zellen in der Schleimhaut des oberen Gastrointestinaltraktes.
Man unterscheidet zwischen überwiegend glandotropen und überwiegend effektorischen Hormonen. Erstere beeinflussen hauptsächlich endokrine Organe und regeln deren Größe und Hormonproduktion. Letztere wirken auf den Allgemeinstoffwechsel. Außerdem gibt es noch Gewebshormone wie Histamin, Serotonin und Gastrin, sowie nervale Überträgerstoffe wie Acetylcholin und Noradrenalin.

Je nach ihrem chemischen Aufbau unterscheidet man:

α) Hormone, die sich von Aminosäuren ableiten
β) Peptide
γ) Proteine
δ) Glycoproteine
ε) Steroide

2. Wirkungsweise [11,12]

Hormone aktivieren Enzyme oder Enzymsysteme, verändern die Permeabilität der Zellmembranen und induzieren die Neubildung oder Mehrproduktion von Enyzmen.
Nach Jacob und Monod [13] wird die Enzyminduktion [1] schon bei der Bildung der m-RNA reguliert, wobei nicht nur die Aktivität eines Gens sondern die einer ganzen Gruppe von Genen in diesen Prozeß einbezogen wird. Diese Gruppe nennt man Operon. Am Anfang steht ein Operator-Gen, das nur Regulationsfunktion hat. Die folgenden Gene heißen Strukturgene, da sie die Struktur bestimmter Enzymproteine determinieren. Für die Kontrolle des Operator-Gens ist ein weiteres Gen, das Regulator-Gen verantwortlich. Dieses bildet einen für Regulator und Operator spezifischen "Repressor". Der Repressor ist spezifisch für das Operator-Gen und außerdem für den Enzyminduktor, d.h. das Substrat. In der Zelle verbindet sich der Induktor mit dem Repressor und dieser Komplex kann das Operator-Gen nicht mehr blokkieren. Die Synthese der m-RNA und damit die Synthese des entpsrechenden Enzymproteins beginnt.

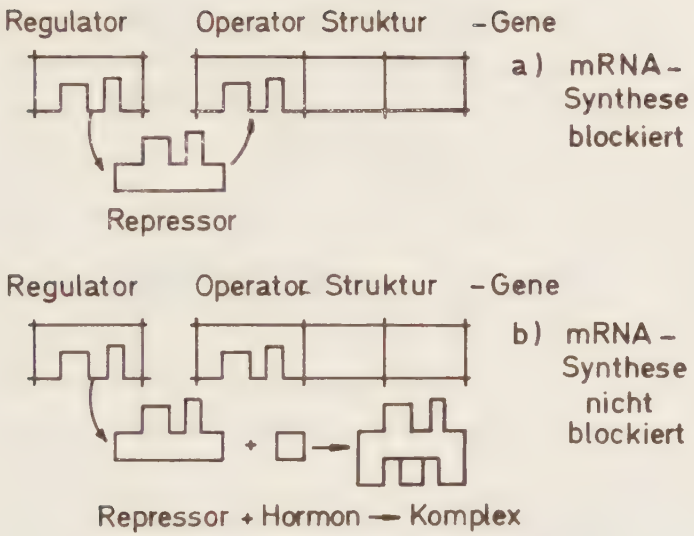


Abb. 5: Regulation der Genaktivität durch Hormone nach Jacob und Monod (nach Karlson 1970)

Eine andere Theorie stammt von Sutherland [14]. Hiernach verbindet sich das Hormon in der Zellmembran mit einem Rezeptor. Der entstandene Komplex steigert die Aktivität einer spezifischen Adenylcyclase. Dadurch wird ein "second messenger" gebildet, das 3',5'-Adenosin-monophosphat, von dem man annimmt, daß es als zentrale Substanz in viele Stoffwechselvorgänge eingreift.

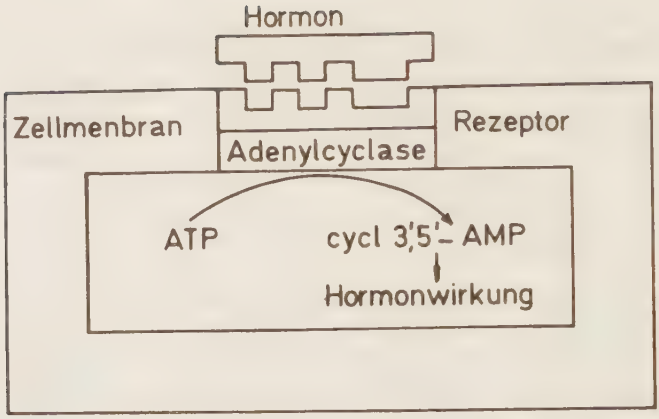


Abb. 6: "Second-Messenger"-Prinzip nach Sutherland (nach Schultz, 1971)

Es wird angenommen, daß keine der beiden Theorien allein auftritt. Mit beiden Theorien zusammen können aber die meisten Hormonwirkungen erklärt werden.

II. Problematik der Peptidsynthese

Die Peptid-Naturstoffsynthese hat seit dem ersten Schritt, der künstlichen Darstellung des Oxytoxins [15], eine stürmische Weiterentwicklung erlebt. Immer wieder wurden neue Synthesewege gesucht.
Der wesentliche Schritt bei der Peptidsynthese ist die Knüpfung der Peptidbindung zwischen der Carboxylgruppe der ersten Aminosäure und der Aminogruppe der zweiten Aminosäure.

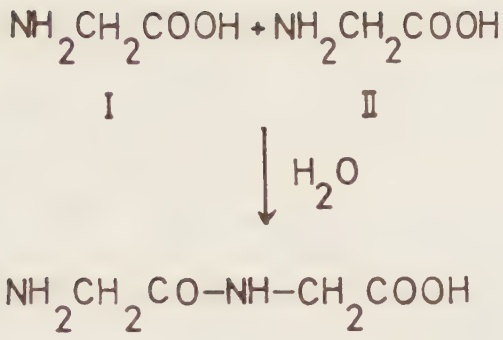


Abb. 7: Allgemeiner Mechanismus der Peptidknüpfung

Diese Reaktion setzt eine Aktivierung der Carboxylgruppe von I voraus, damit der Stickstoff der zweiten Aminosäure mit seinem freien Elektronenpaar am positivierten Carboxyl-Kohlenstoff von II angreifen kann. Da die in Reaktion tretende Aminosäure jeweils beide an der Peptidbildung beteiligten funktionellen Gruppen im Molekül enthält, genügt die Aktivierung der als Acylierungsreagens fungierenden Aminosäure alleine nicht, um zu einem definierten Dipeptid zu gelangen. Die zu acylierende Aminosäure muß durch eine entsprechende Carboxylschutzgruppe aus dem Zwitterionenzustand entbunden werden, wodurch diese erst die für die Reaktion erforderliche nucleophile Potenz zurückerhält. Um also die Bildung einer Vielzahl cyclischer und linearer Peptide zu verhindern, muß man diejenigen Amino- und Carboxylgruppen, die in einem bestimmten Syntheseschritt nicht reagieren sollen, selektiv schützen [4]. Man unterscheidet hierbei zwischen Schutzgruppen, die nach jedem Kupplungsschritt abgespalten werden, und solchen, die erst am Schluß der Gesamtsynthese entfernt werden.

1. Kupplungsmethoden

Seitdem 1901 Emil Fischer und E. Fourneau das erste Peptid Glycyl-Glycin synthetisierten, sind zahlreiche Methoden zur Peptidverknüpfung entwickelt worden.

So führte 1902 Th. Curtius die Azidmethode [16,17] ein. Ihr großer Vorteil liegt in einem nahezu racemisierungsfreien Ablauf der Reaktion. Von Nachteil ist die Bildung schwer abzutrennender Harnstoffderivate [18,19].

Eine weitere oftmals angewandte Methode ist die Aktivierung der Carboxylgruppe von Aminosäuren durch die Bildung symmetrischer und gemischter Anhydride [20,21,22]. Diese Reaktion läßt sich auch bei der Festphasensynthese nach Merrifield [8,9] anwenden. Hierdurch läßt sich der störende Dicyclohexylharnstoff ausschließen [23]. Außerdem läßt sich dadurch die Reaktionszeit verkürzen.

Neben weiteren Methoden, wie der der Aktivester [24,25,26], der Isocyanat- und der Säurechloridmethode ist heute die Carbodiimid-Methode von J.C. Sheehan und G.W. Hess [27,28] am gebräuchlichsten. Am häufigsten wird hierbei N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCCI) verwendet.

Nach H.G. Khorana verläuft der erste Schritt der Reaktion über eine Addition der Carboxylgruppe an das Diimid zu einem O-Acyl-Lactim, das mit der Aminokomponente unter Abspaltung von N,N'-Dicyclohexylharnstoff (DCH) direkt das Peptidderivat bildet [29,30] oder mit einer weiteren Acylaminosäure unter Austritt von DCH zum symmetrischen Anhydrid (II) reagiert. Letzteres kann von der Aminokomponente aminolytisch aufgespalten werden, wobei neben dem Peptidderivat ein Mol Acylaminosäure zurückgebildet wird [4].

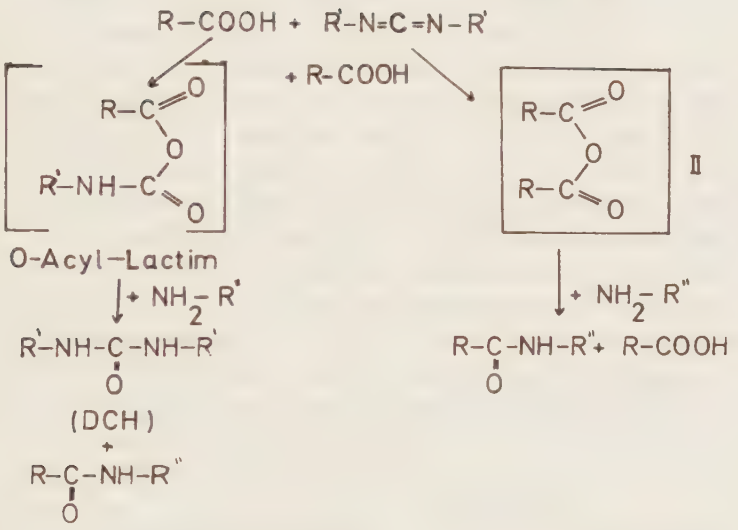


Abb. 8: Bildung von Peptiden nach der Carbodiimid-Methode von Sheehan und Hess

Um oftmals beobachtete Racemisierungsreaktionen zu vermeiden, haben E. Wünsch durch Zusatz von N-Hydroxy-Succinimid [31] und W. König und G. Geiger durch Zusatz von N-Hydroxybenzotriazol [32] aus dem gebildeten O-Acyl-Lactim die jeweiligen Ester hergestellt, die äußerst reaktiv sind und mit der Aminokomponente racemisierungsfrei reagieren.

2. Schutzgruppen

Von den vielen eingeführten Schutzgruppen sind nur wenige auf Grund ihrer Wirkungsweise und Abspaltbarkeit gebräuchlich. Hierbei unterscheidet man ganz allgemein Amino-, Carboxyl-, Hydroxyl- und Thioschutzgruppen.
Die gebräuchlichsten Aminoschutzgruppen haben Urethanstruktur und lassen sich mittels Säuren abspalten. Die Benzyloxycarbonyl-Gruppe läßt sich leicht durch katalytische Hydrierung, durch Natrium in flüssigem Ammoniak oder durch Acidolyse mit Bromwasserstoff in Eisessig abspalten [33].
Ihre Einführung in Aminosäuren und Peptide folgt sehr leicht durch Umsetzung mit Chlorkohlensäurebenzylester nach Schotten-Baumann.
Die tert.-Butyloxycarbonyl-Gruppe (Boc-Gruppe) [34-37] läßt sich mit Trifluoressigsäure in der Kälte abspalten.

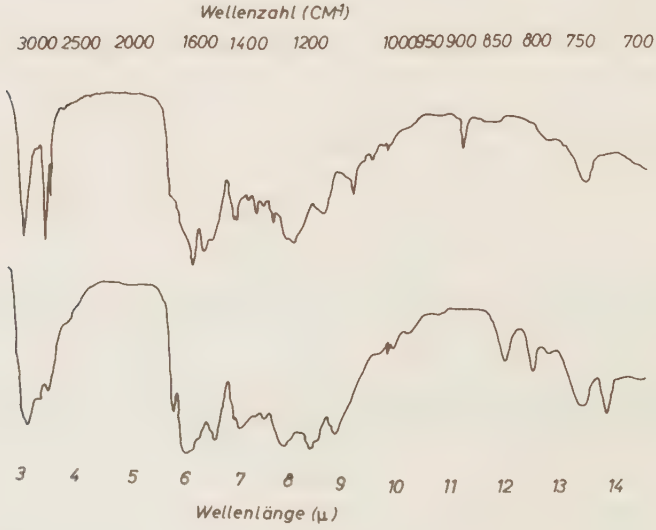


Abb. 9: IR-Spektrum mit und ohne Boc-Schutzgruppe

Unter diesen Bedingungen wird die Z-Gruppe nicht angegriffen. Weiterhin gelingt die Abspaltung gut mit 1 N HCl in Eisessig und mit Bortrifluorid-Ätherat in Essigsäure bzw. Essigsäure-Chloroform-Mischungen [38,39].

Während der Peptidsynthese muß auch die Carbonylfunktion der Aminokomponente blockiert werden. Im allgemeinen benutzt man verschiedene Ester und substituierte Hydrazide [40].

Hydroxy-Funktionen werden meist mit der Benzylgruppe oder der tert.-Butylgruppe blockiert [41,42]. O-Benzylgruppen lassen sich neben der katalytischen Hydrierung mit HBr in Eisessig, HBr in Trifluoressigsäure und Natrium in flüssigem Ammoniak entfernen. Tert.-Butyläther lassen sich leicht in Säuren spalten.

Beim Histidin werden sowohl die Aminokomponente als auch der Imidazolstickstoff für die Merrifield-Synthese mit der tert.-Butyloxycarbonylazid-Gruppe [43,44,45,46,47] geschützt.

Ein weiteres Problem bei dieser Peptidsynthese ist der Schutz der Guanidino-Gruppe des Arginins. Geeignete Schutzgruppen sind die Tosyl- [48], die Nitro- [49], aber auch die Einführung von zwei Adamantyloxycarbonyl- [50] oder Isobornyloxycarbonyl-Gruppen [51].

3. Synthesemöglichkeiten der Peptide

α) Klassische Synthese

Hierbei lassen sich zwei Strategien unterscheiden und zwar die konventionelle Synthese (I) unter weitgehender Markierung der Seitenkettenfunktion mehrfunktioneller Aminosäuren und die konventionelle Synthese (II) unter geringstmöglicher Markierung der Drittfunktionen mehrfunktioneller Aminosäuren [52].

Dem Aufbau größerer Peptide mit mehr als 30 Aminosäuren steht bei der klassischen Synthese die Abnahme der Lös-

lichkeit mit zunehmender Kettenlänge im Wege [52]. Um diese Löslichkeitsprobleme zu umgehen, wurden deshalb neue Synthesewege gesucht.

ß) Trägersynthesen

Wie schon oben erwähnt, soll mittels Trägersynthesen das Problem der Löslichkeit bei größeren Peptiden umgangen werden. Bei der von Merrifield 1963 [8] eingeführten Peptidsynthese wird die C-terminale Aminogruppe mit einem unlöslichen Polystyrolträger verestert und stufenweise werden Aminosäuren an die erste Aminosäure angeknüpft. Um Fehlsequenzen möglichst zu vermeiden, wird ein Überschuß an aktivierten Aminosäurederivaten eingesetzt [53].

Vergleiche mit bereits hergestellten Merrifield-Peptiden sind auf Grund herstellungsbedingter Unterschiede der Träger kaum möglich, da Korngröße, Quellbarkeit und Zahl der reaktiven Gruppen nicht immer gleich sind. Hierauf beruhen auch die Nachteile einer automatischen Merrifield-Synthese.

Schwierigkeiten bereitet die Abtrennung und Reinigung kleiner Peptidsequenzen, da die Fehlsequenzen mit dem gewünschten Peptid eng verwandt sind. Die Zahl der Fehlsequenzen nimmt, wie von E. Bayer et. al. [53,54] gezeigt wurde, mit zunehmender Kettenlänge exponentiell zu.

Die Merrifield-Synthese verknüpft die C-terminale Aminosäure über eine Benzylester-Bindung mit dem chlormethylierten Harz.

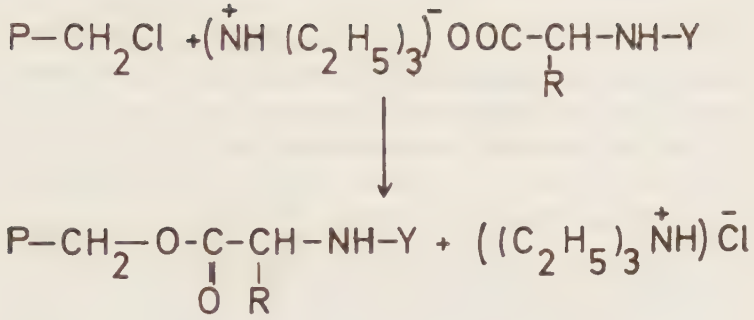


Abb. 10: Kupplung der ersten Aminosäure an das Harz

Die Aminoschutzgruppen werden abgespalten und die weiteren Boc-Aminosäuren mit Dicyclohexylcarbodiimid stufenweise angebaut. Pro Kupplungsschritt benötigt man etwa 2-4 Stunden. Bei dieser Syntheseart entstehen schon dadurch Fehlsequenzen, daß nichtumgesetzte Chlormethylgruppen des Harzes mit später vorkommenden Aminosäuren verestert werden. Dies läßt sich selbst durch längere Kupplungszeiten nur schwerlich vermeiden. Auch mit den neuerdings verwendeten, einem löslichen Träger ähnelnden 1% vernetzten Polystyrolen [55] und Glass-Beads [56] lassen sich Fehlsequenzen nicht vollständig ausschließen. Eine Mischung zwischen klassischer Synthese und der Festphasensynthese nach Merrifield ist die von M. Mutter und E. Bayer gefundene Flüssigkeitsphasenmethode (Liquid-Phase-Synthese) [57,58]. Bei dieser Synthese wird die C-terminale Aminosäure mit Polyäthylenglykol (PEG) verestert. Der Vorteil des Polyäthylenglykols liegt darin, daß es einerseits als Träger dient, andererseits selbst längere Peptide löslich macht. Die Reaktion läuft schneller ab und ist gut kontrollierbar. Im Gegensatz zum festen Träger lassen sich auch Hydrierungen am Träger durchführen.

III. Merrifield-Methode

1. Trägermaterial

Das zur Synthese verwendete Material ist ein in den verwendeten Lösungsmitteln unlösliches Polymer. Neben Cellulose, Polyvinylalkohol und Polymethylacrylat erwies sich ein chlormethyliertes Copolymer aus Styrol und Divinylbenzol (2% quervernetzt) am geeignetsten.

2. Kupplung der 1. Aminosäure an den Träger

Bei Verwendung eines Chlorid-Harzes wird die erste geschützte Aminosäure nach der von Merrifield beschriebenen Methode mit Triäthylamin in absolutem Äthanol unter Rückfluß gekocht und so mit dem Harz verknüpft [35,36]. Nach einer Variante von H. Grüb [59] läßt sich dieser Vorgang in einer Ampulle durchführen, wodurch Siedeverzüge und damit verbundene Substanzverluste vermieden werden.

Nach einer neueren Methode von A. Marglin [60] verwendet man an Stelle des Äthanols Dimethylformamid und schüttelt die Mischung 24 Stunden bei Raumtempertaur. Durch diese Veresterung bei Raumtemperatur lassen sich Nebenreaktionen besser vermeiden.
Die Beladung des Harzes wird durch Hydrolyse einer kleinen Probe mit 6 N HCl und anschließender Aminosäureanalyse an einem Unichrom, Beckman Instruments, bestimmt.

3. Abspaltung der Schutzgruppen

Um die Aminogruppe der zuletzt eingeführten Aminosäure zu kuppeln, muß die Boc-Schutzgruppe abgespalten werden. Hierzu verwendet man Trifluoressigsäure in Methylenchlorid (1:1) [61]. Nach der Abspaltung wird durch einen Überschuß von Triäthylamin in Methylenchlorid (2:1) neutralisiert.

4. Abspaltung des Peptids vom Harz

Für die Abspaltung des fertigen Peptids vom Träger lassen sich je nach Zusammensetzung des Endproduktes verschiedene Möglichkeiten anwenden. So erhält man durch Ammonolyse [62] das Amid, während bei der Abspaltung durch Einleiten von HBr in Trifluoressigsäure das Salz des Peptids entsteht [62].

Nach der Abspaltung des Peptids vom Träger werden noch vorhandene Schutzgruppen abhydriert. Schwierigkeiten macht hierbei die saure Hydrierung methioninhaltiger Peptide. Diese ist im alkalischen Medium unter Zusatz von Triäthylamin bzw. Cyclohexylamin möglich [63,64,65,66].

IV. Synthese der Merrifield-Sequenzen

Die Peptide H-L-Ser-L-Tyr-L-Ser-L-Met-OH, H-L-Ser-L-Tyr-L-Ser-L-Met-L-Glu-L-His-L-Phe-L-Arg-L-Trp-Gly-OH und H-L-His-L-Phe-L-Arg-L-Trp-Gly-OH werden entsprechend den Abbildungen 11 - 13 synthetisiert. Die Peptidbindung wird hierbei mit DCCI [27] in Methylenchlorid geknüpft. Dabei wird die Carboxylgruppe der Boc-Aminosäure mit der freien Aminogruppe der an das Harz gebundenen Aminosäure verbunden. Aus dem Kondensationsmittel entsteht dabei unter Aufnahme von Wasser Dicyclohexylharnstoff.

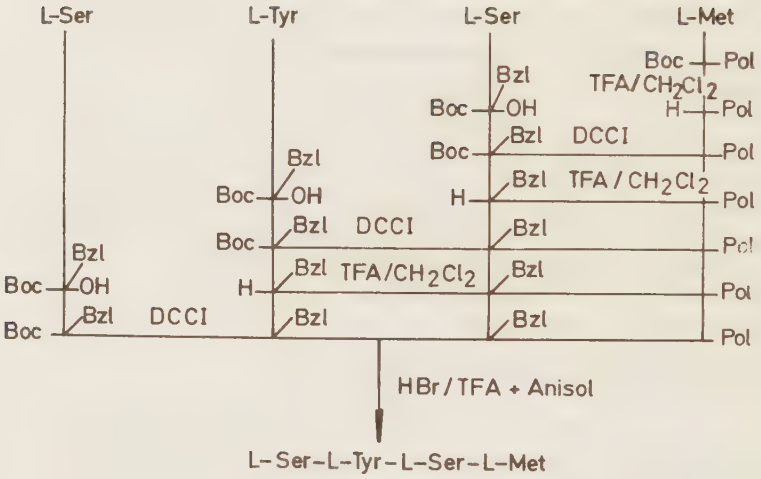


Abb. 11: Syntheseschema von H-Ser-Tyr-Ser-Met-OH nach Merrifield

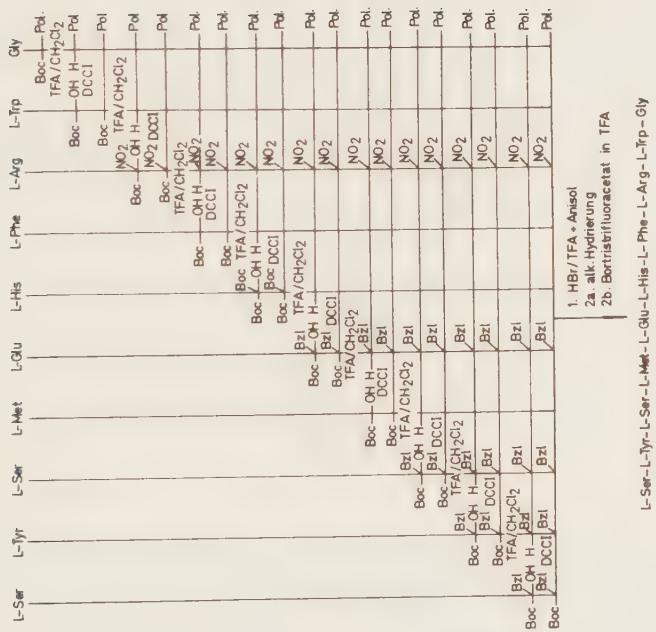


Abb. 12: Syntheseschema von H-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-OH nach Merrifield

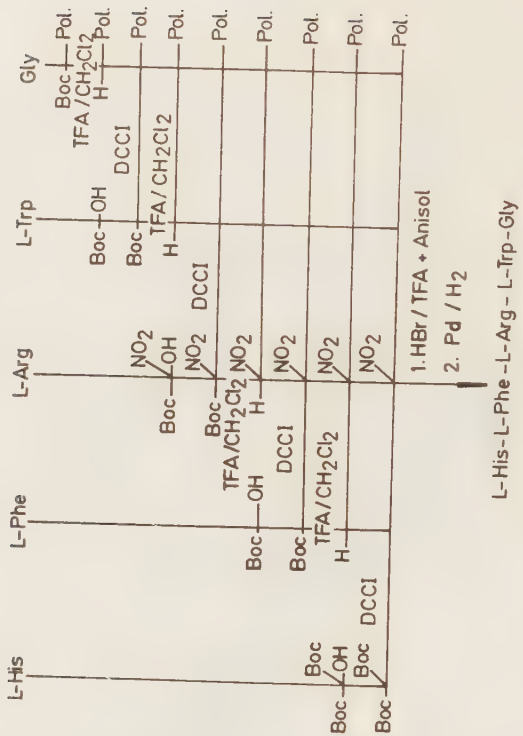


Abb. 13: Syntheseschema von H-His-Phe-Arg-Trp-Gly nach Merrifield

1. Fragmente 1 - 10 des ACTH (Abb. 12)

Zur Synthese wird Boc-Glycin mit dem Harz verestert [60]. Nach Waschen mit DMF, Wasser, Methanol und Methylenchlorid und gutem Trocknen wird durch Aminosäureanalyse die Beladung des Harzes bestimmt. Danach richtet sich dann die Menge der eingesetzten Aminosäuren.
Zur weiteren Synthese wird das Peptidharz mit Methylenchlorid und Äthanol mehrmals gewaschen, mit Methylenchlorid/Trifluoressigsäure (1:1) [61] wird die Boc-Gruppe abgespalten und anschließend mit Methylenchlorid/Triäthylamin (1:2) neutralisiert. Nach erneutem Waschen werden die Boc-Aminosäuren nach diesem Syntheseweg in der gewünschten Reihenfolge mit einem Überschuß an DCCI in Methylenchlorid gekuppelt. Boc-Tryptophan wird durch einen 10%-igen Zusatz von DMF, Boc-L-Arg(NO_2)OH nur in DMF gekuppelt.
Die Seitenketten trifunktioneller Aminosäuren werden wie folgt geschützt:
Arginin wird als Boc-L-Arg(NO_2)-OH, Histidin als Boc-L-His(Boc)-OH [43,44], Glutaminsäure als Boc-L-Glu(OBzl)-OH, Serin und Tyrosin als Boc-L-Benzyläther eingesetzt.

2. Fragmente 1 - 4 und 6 - 10 (Abb. 11, Abb. 13)

Wie beim Fragment 1 - 10 werden Boc-Methionin bzw. Boc-Glycin mit dem chlormethylierten Träger verestert und anschließend die weiteren geschützten Aminosäuren mittels der DCCI-Methode entsprechend ihrer Reihenfolge im Peptid gekuppelt. Bei den trifunktionellen Aminosäuren werden die gleichen Schutzgruppen verwendet wie bei Fragment 1 - 10.

V. Klassische Synthesen

1. Synthese von L-Ser-L-Tyr-L-Ser-L-Met-OH

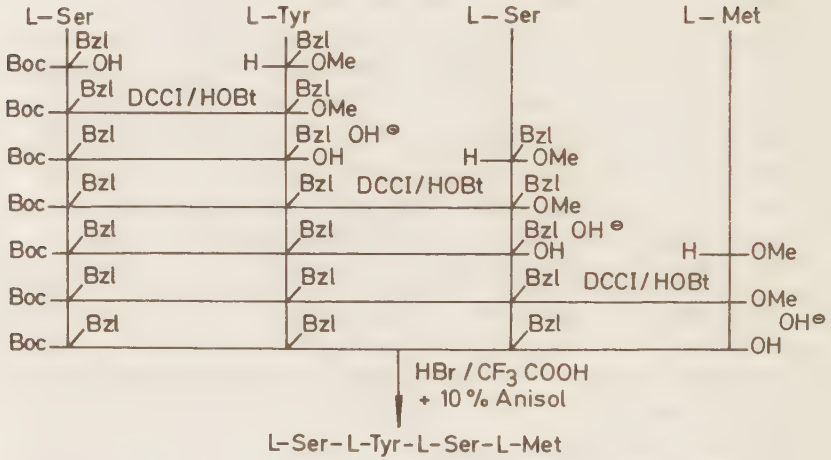


Abb. 14: Syntheseschema von L-Ser-L-Tyr-L-Ser-L-Met-OH

Das Serin-Derivat wird mittels DCCI/HOBt mit dem Tyrosin-O-Benzyläther-Methylesterhydrochlorid in Dimethylformamid zum Dipeptidderivat gekuppelt. Dieses wird in Methanol mit 1 N Natronlauge verseift. Anschließende Umsetzung (DCCI/HOBt) mit O-Benzyl-L-serinmethylesterhydrochlorid ergibt das geschützte Tripeptid. Nach erneuter Verseifung und Kupplung mit L-Methioninmethylesterhydrochlorid erhält man die gewünschte, geschützte Teilsequenz 1 - 4 des ACTH. Nach Abspaltung der Schutzgruppen mit HBr/TFA erhält man das ungeschützte Tetrapeptid [67].

Sämtliche Zwischenstufen lassen sich gut reinigen und sind größtenteils gut kristallisierbar. Die Ausbeuten sind gut.

2. Synthese von L-His-L-Phe-L-Arg-L-Trp-Gly-OH

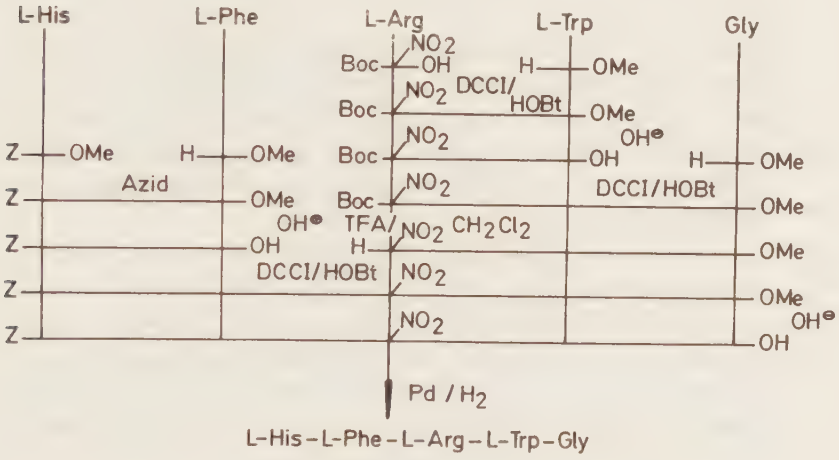


Abb. 15: Syntheseschema von L-His-L-Phe-L-Arg-L-Trp-Gly-OH

Das Pentapeptid L-His-L-Phe-L-Arg-L-Trp-Gly-OH ist in der Literatur bereits beschrieben. In dieser Arbeit wurde ein anderer Syntheseweg beschritten [68].
Zuerst wird das geschützte Tripeptid L-Arg(NO_2)-L-Trp-Gly-OMe-TFA-Salz synthetisiert. Boc-L-Arg(NO_2)-OH wird mittels DCCI/HOBt unter Zusatz von N-Methylmorpholin mit dem L-Tryptophanmethylesterhydrochlorid zum Dipeptidderivat Boc-L-Arg(NO_2)-L-Trp-OMe gekuppelt. Dieses wird in wässe-

rigem Methanol mit 1 N NaOH verseift und mit Glycinmethylesterhydrochlorid zum geschützten Tripeptid umgesetzt. Anschließend spaltet man die Boc-Schutzgruppe mit TFA/CH_2Cl_2 ab und erhält das TFA-Salz des geschützten Tripeptids.

Das Dipeptid Z-His-L-Phe-OMe wird durch Azidkupplung von Z-L-His-OMe und L-Phe-OMe erhalten. Die Verseifung in Methanol mit 1 N NaOH führt zum Dipeptidderivat mit freier Carboxylgruppe.

Mittels der DCCI/HOBt-Methode wird aus dem geschützten Dipeptid Z-L-His-L-Phe-OH und dem geschützten Tripeptid TFA-L-Arg(NO_2)-L-Trp-Gly-OMe das geschützte Pentapeptid mit der ACTH-Sequenz 6 - 10 synthetisiert. Nach Verseifung und Hydrierung mit Palladium/Aktivkohle erhält man das freie Peptid.

Beide Zwischenstufen, das Dipeptidderivat Z-L-His-L-Phe-OH und das Tripeptidderivat TFA-L-Arg(NO_2)-L-Trp-Gly-OMe, wurden bereits hergestellt. Die Ausbeuten und die physikalisch-chemischen Daten stimmen praktisch überein. Um eine mehrmalige Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure/Methylenchlorid zu vermeiden, wurde das Peptid von der Argininseite her aufgebaut.

3. Synthese von L-Ser-L-Tyr-L-Ser-L-Met-L-Glu-L-His-L-Phe-L-Arg-L-Trp-GlyOH

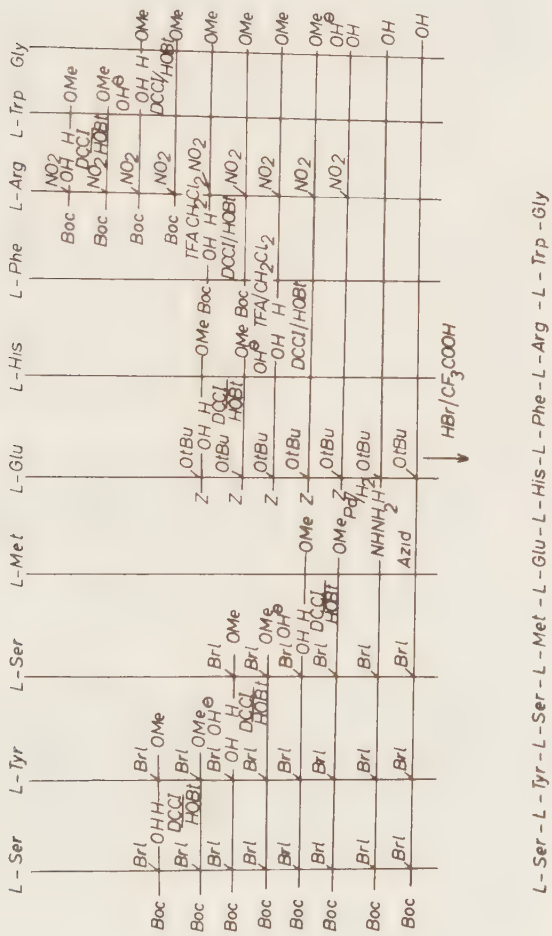


Abb. 16: Syntheseschema zur Darstellung der ACTH-Teilsequenz H-L-Ser-L-Tyr-L-Ser-L-Met-L-Glu-L-His-L-Phe-L-Arg-L-Trp-Gly-OH

Das Decapeptid L-Ser-L-Tyr-L-Ser-L-Met-L-Glu-L-His-L-Phe-L-Arg-L-Trp-Gly-OH wurde unter anderem bereits von Li et. al. synthetisiert [69].

In der folgenden Synthese wird zuerst das Tripeptid L-Arg(NO_2)-L-Trp-Gly-OMe mit Boc-L-Phe zum Tetrapeptid Boc-L-Phe-L-Arg(NO_2)-L-Trp-Gly-OMe gekuppelt. Gleichzeitig wird Z-L-Glu(OtBu)-L-His-OMe dargestellt. Nach Boc-Abspaltung und Verseifung kuppelt man in Gegenwart von DCCI und 1-Hydroxybenzotriazol zum Hexapeptid Z-L-Glu(OtBu)-L-His-L-Phe-L-Arg(NO_2)-L-Trp-Gly-OMe(I).

In einer anderen Synthese (s.S. 22) wird das Tetrapeptid Boc-L-Ser-L-Tyr-L-Ser-L-Met-OMe (II) hergestellt.
Zur Darstellung des Decapeptids wird das Peptid I mit 1 N NaOH verseift und mit Palladium/Aktivkohle hydriert. Das Tetrapeptid II wird über das Hydrazid in das Azid übergeführt und mit dem teilweise noch geschützten Peptid zum Decapeptid gekuppelt.
Nach Abspaltung der noch vorhandenen Benzyl- und tert. Butylgruppen mit Trifluoressigsäure und Behandlung mit einem Ionenaustauscher erhält man das freie Decapeptid.

VI. Spektroskopische Methoden

1) ^{13}C-NMR-Spektroskopie:

Freie Aminosäuren, geschützte Aminosäuren [70] und einzelne Dipeptide werden mit der ^{13}C-NMR-Spektroskopie vermessen. Die ^{13}C-NMR-Spektroskopie wird seit der Entwicklung der Puls-Fourier-Technik [70,71] zu einer immer wichtigeren Methode zur Bestimmung der Strukturen organischer Moleküle und Naturstoffe [72,73].

1.1. Glycin und Derivate

Bereits 1970 wurden die ^{13}C-chemischen Verschiebungen der Signale von Glycin von Horsley et al. veröffentlicht [74]. Hierbei wurde statt des natürlichen Gehalts an ^{13}C (1,1%) ein angereicherter von 15% verwendet. Tabelle 1 zeigt die chemischen Verschiebungen von Glycin sowie den Derivaten Boc-Glycin und Glycinmethylesterhydrochlorid.

	Gly-OH	Gly-OMe - HCl	Boc-Gly-OH
C 1	173,50	167,70	172,10
C 2	42,50	40,20	40,10
C 3		51,37	156,10
C 4			78,35
C 5			28,25

Tabelle 1: ^{13}C-NMR-chemische Verschiebungen von Glycin und Derivaten. Die ppm-Werte sind auf TMS = 0 bezogen; Gly-OH wurde in D_2O, die übrigen Verbindungen in DMSO gemessen.

Zur Signalzuordnung verwendet man den spektralen Vergleich zwischen einfachen Derivaten und komplexeren Molekülen. Die Zusammenhänge können am übersichtlichsten durch ^{13}C-NMR-Strichspektren erkannt werden.

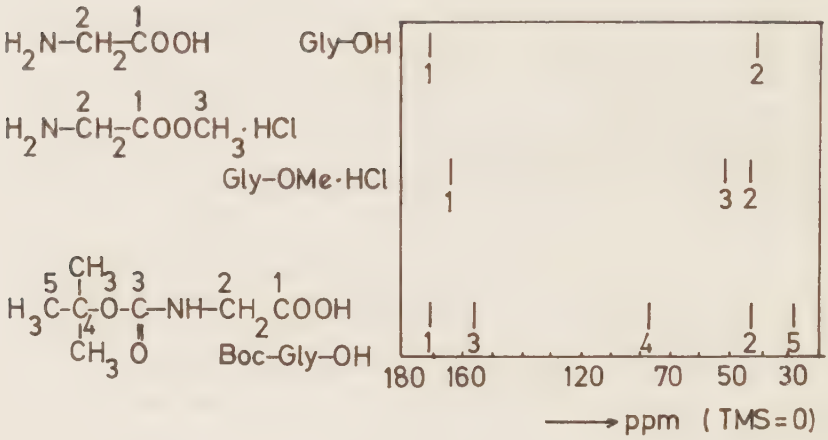


Abb. 17: ^{13}C-NMR-Spektrum von Glycin und Derivaten

Das Strichspektrum zeigt, daß das C-terminale Kohlenstoffatom des Glycins in einem ppm-Bereich von 168 bis 174 absorbiert und daß das N-terminale C-Atom zwischen 40 und 44 liegt. Die restlichen Signale in den Spektren von Boc-Gly-OH und Gly-OMe.HCl müssen durch die C-Atome der t-Butyloxycarbonylgruppe bzw. die Methylgruppe des Methylesters verursacht werden. Hierbei lassen sich die Kohlenstoffatome der drei Methylgruppen des t-Butyloxycarbonylrestes nicht voneinander unterscheiden. Ihr Signal liegt mit großer Intensität bei höchstem Feld. Das Carbonylkohlenstoffatom des Boc-Restes absorbiert von allen C-Atomen der Schutzgruppe bei tiefstem Feld. Das noch verbliebene Signal läßt sich dem quartären Kohlenstoffatom des t-Butylrestes zuordnen.

1.2. Tryptophan und Derivate

Die ^{13}C-chemischen Verschiebungen von Tryptophan wurden bereits früher veröffentlicht [75], konnten allerdings aus Mangel an Daten analoger Verbindungen noch nicht zugeordnet werden. Die C-Atome des nichtaromatischen Anteils lassen sich durch Vergleich mit ähnlichen Verbindungen zuordnen. Den aromatischen Teil des Tryptophans kann man mit 3-Methyl-Indol vergleichen [76].

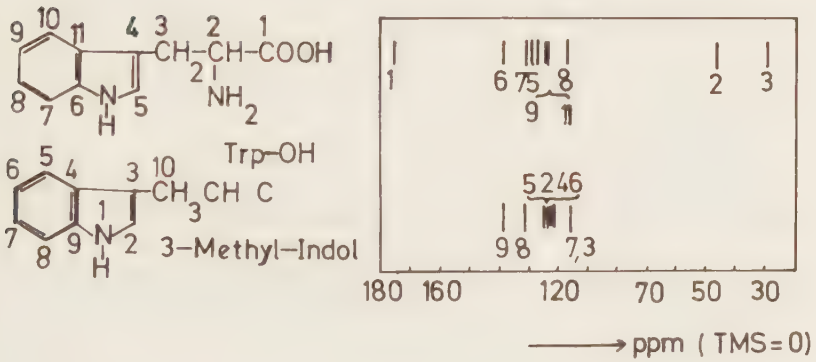


Abb. 18: ^{13}C-NMR-Strichspektrum von Tryptophan und 3-Methyl-Indol

Obige Zuordnung wird auch bei Abb. 19 angewandt.

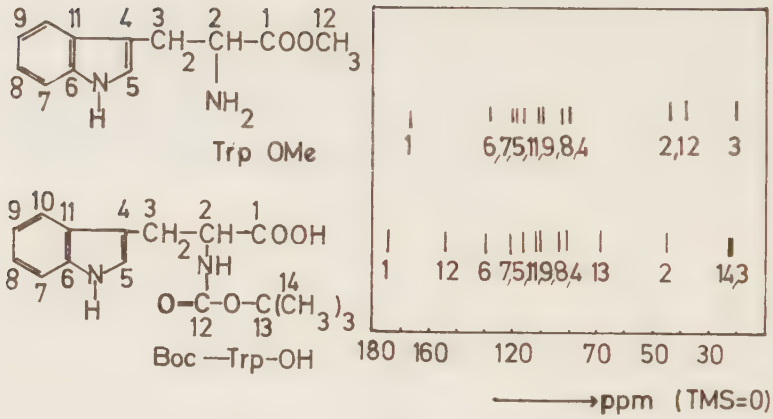


Abb. 19: ^{13}C-NMR-Strichspektrum von Tryptophanderivaten

Die Methylgruppen der t-Butyloxycarbonylgruppe absorbieren wiederum bei höchstem, das Carbonylkohlenstoffatom des Boc-Restes bei sehr tiefem Feld.

Name	Aminosäureanteil COOH COOR	C	C	$C_{arom.}$
L-Trp-OH[77,78]	174,70 (1)	56,00 (2)	28,20 (3)	114,58 (8) 120,50 (9,11) 121,80 (9,11) 124,50 (10) 127,60 (5) 128,90 (7)
Boc-L-Trp-OH	174,25 (1)	54,80 (2)	26,95 (3)	136,25 (6) 110,35 (4) 111,55 (8) 118,45 (9,11) 118,70 (9,11) 121,05 (10) 123,85 (5) 127,40 (7) 136,25 (6)
L-Trp.OMe	170,15	53,00	26,45	106,70 (4) 111,65 (8) 118,05 (9,11) 118,55 (9,11) 121,25 (10) 125,05 (5) 127,00 (7) 136,25 (6)

Name	Schutzgruppen C = O	C_t	CH_3	OCH_3
L-Trp-OH[77,78]				
Boc-L-Trp-OH	155,60 (12)	78,20 (13)	28,40 (14)	
L-Trp-OMe				45,30

Tabelle 2: ^{13}C-NMR-chemische Verschiebungen von Tryptophan und Derivaten. Die ppm-Werte sind auf TMS = 0 bezogen; L-Trp-OH wurde in D_2O, die anderen Verbindungen in DMSO gemessen.

1.3. Arginin und Derivate

Die ^{13}C-chemischen Verschiebungen von Arginin sind bereits früher zugeordnet und beschrieben worden [74,77]. Die hier vermessenen Derivate werden danach zugeordnet.

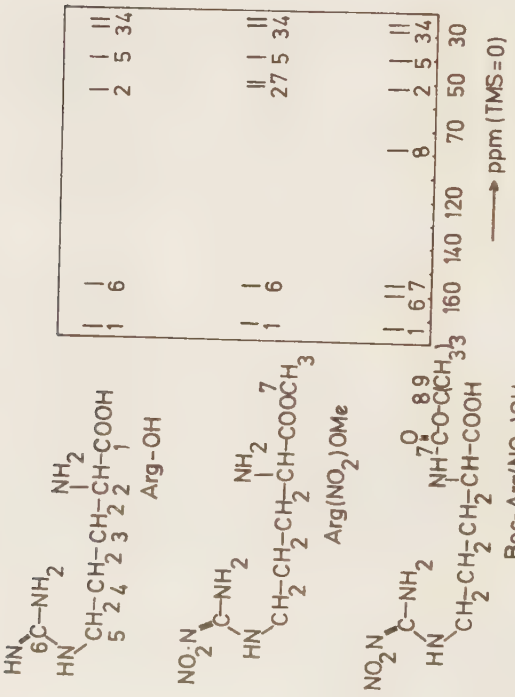


Abb. 20: ^{13}C-NMR-Strichspektren von Arginin und Derivaten

Bei den Derivaten des Arginins übt die Nitrogruppe einen schwachen elektronenziehenden Effekt auf das zentrale C-Atom des Guanidyl-Restes aus.
Der Vergleich von L-Arg-OH mit dem Methylester zeigt, daß sich im Ester das C-1-Atom zu höherem Feld hin verschiebt. Diese Hochfeldverschiebung wird allgemein bei den Estergruppierungen beobachtet. So liegt die Carboxylgruppe der Essigsäure bei -176,9 ppm, während das C-Atom des entsprechenden Esters bei -170,7 ppm liegt.
Die Signale der Boc-Gruppe lassen sich durch Vergleich von Boc-L-Arg(NO_2)-OH mit L-Arg-OH und einer einfachen Boc-Verbindung zuordnen.

	Aminosäureanteil					
Name	COOH	H_2N C=N- -HN	C	C	C	C
L-Arg-OH	175,20	157,50	55,10	28,50	24,90	41,50
Boc-L-Arg (NO_2)OH	174,25	159,55	53,40	28,40	25,25	40,55
L-Arg(NO_2) OMe.HCl	169,80	157,00	53,10	27,20	24,40	40,25

	Schutzgruppen			
Name	C = O	C_t	CH_3	$-OCH_3$
Boc-L-Arg(NO_2)OH	155,80	78,35	28,40	
L-Arg(NO_2)OMe . 2 HCl				51,70

Tabelle 3: ^{13}C-NMR-chemische Verschiebungen von Arginin und Derivaten. Die ppm-Werte sind auf TMS = 0 bezogen. Arg-OH wurde in D_2O, alle übrigen Verbindungen in DMSO gemessen.

1.4. Phenylalanin und Derivate

Phenylalanin wurde schon vermessen und an Hand der ppm-Werte der Stammverbindung lassen sich auch die Derivate zuordnen [70,74].

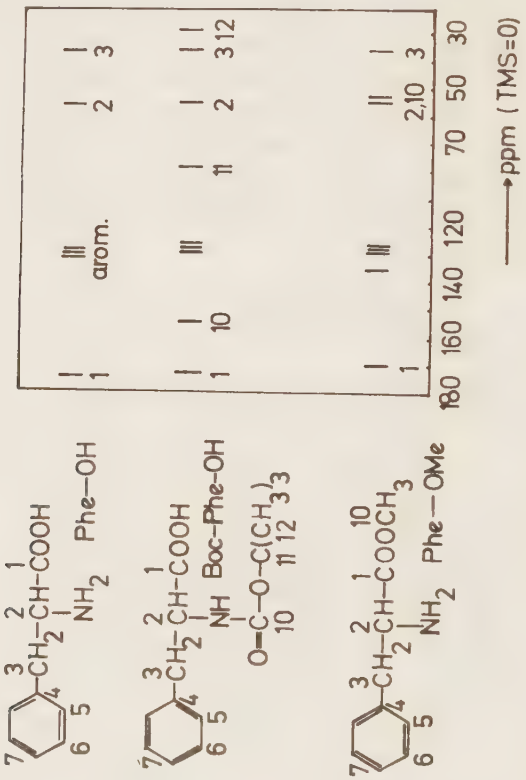


Abb. 21: ^{13}C-NMR-Strichspektrum von Phenylalanin und Derivaten.

Die ^{13}C-chemischen Verschiebungen für das C-Atom der Carboxylgruppe liegt zwischen 175,0 ppm bei der Stammverbindung und 169,39 ppm beim Methylester. Diese Hochfeld-

verschiebung im Ester wird, wie schon oben erwähnt, bei allen Estern festgestellt. Die Resonanzen der aromatischen C-Atome liegen zwischen 135,10 ppm und 125,85 ppm.

	Aminosäureanteil			
Name	COOH COOR	C	C	$C_{arom.}$
L-Phe-OH	175,0	57,3	37,5	129,5 130,7 131,1
Boc-L-Phe-OH	172,7	55,2	36,9	125,85 127,55 128,6
L-Phe-OMe.HCl	163,39	53,60	35,95	135,10 129,30 128,30 127,00

	Schutzgruppen			
Name	C = O	C_t	CH_3	OCH_3
L-Phe-OH				
Boc-L-Phe-OH	154,7	78,0	28,35	
L-Phe-OMe.HCl				52,55

Tabelle 4: ^{13}C-NMR-chemische Verschiebungen von Phenylalanin und Derivaten. Die ppm-Werte sind auf TMS = 0 bezogen. Phe-OH wurde in D_2O gemessen, die anderen Verbindungen in DMSO.

1.5. Histidin und Derivate

Bei Histidinderivaten gelingt die Signalzuordnung der C-Atome des nichtaromatischen Aminosäurerestes durch Vergleich der Spektren mit dem der entsprechenden Stammverbindung. Auf Grund der in der Literatur [78] bekannten Zu-

ordnung der Histidin-Signale können die Resonanzen des Histidinrestes z.B. im L-His.OMe HCl eindeutig identifiziert werden.

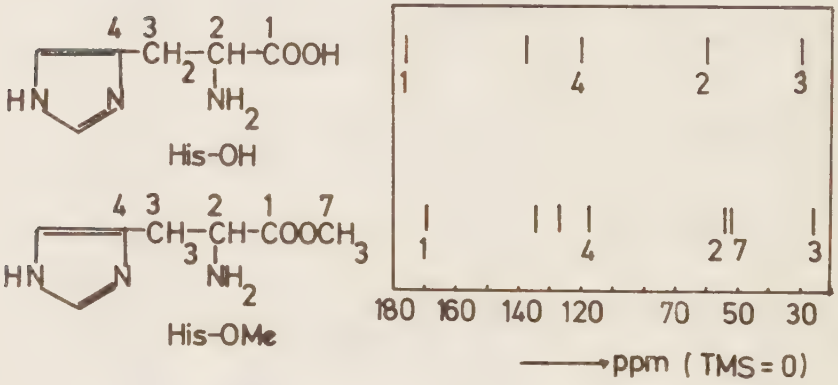


Abb. 22: ^{13}C-NMR-Strichspektrum von Histidin und Derivaten

Sowohl beim H-L-His-OH als auch beim Methylester liegt das C-1-Signal bei tiefstem Feld. Beim Ester wird wieder die übliche Tieffeldverschiebung beobachtet [79].

	Aminosäureanteil				
Name	COOH	C	C	$C_{arom.}$	OCH_3
L-His-OH	174,9	58,8	29,0	118,2 137,2	
L-His-OMe	168,75	53,40	25,35	118,35 126,75 134,35	51,35

Tabelle 5: ^{13}C-NMR-chemische Verschiebungen von Histidin und Derivaten

1.6. Glutaminsäure und Derivate

Durch Vergleich der Aminosäurederivate mit der schon vorher publizierten Stammverbindung konnten die Signale eindeutig zugeordnet werden [74].

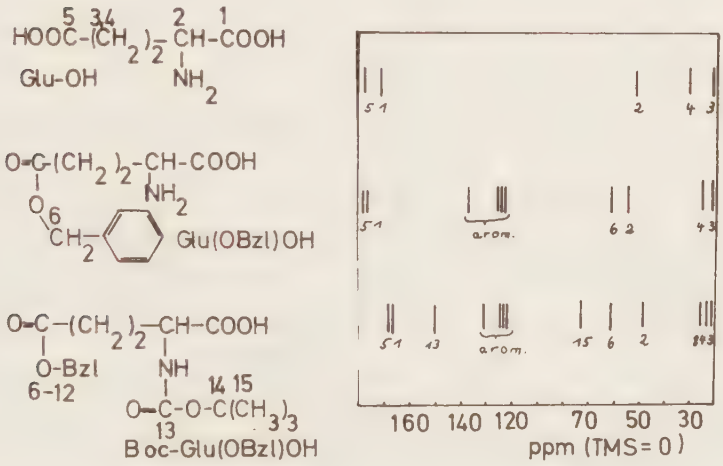


Abb. 23: ^{13}C-NMR-Strichspektrum von Glutaminsäure und Derivaten

Die beiden Signale der freien Carboxylgruppen erscheinen bei tiefstem Feld, wobei die Nachbarschaft der -CH(NH_2)-Gruppe gegenüber dem CH_2-Rest eine Tieffeldverschiebung verursacht. Die Resonanz des mit der Aminogruppe verknüpften C-Atoms ist charakteristisch für -C-Atome von

Aminosäuren und Peptiden. Durch Vergleich der Stammverbindung mit den Derivaten kann die Signalzuordnung der Aminosäurederivate eindeutig getroffen werden. Die Signale des OCP-Restes lassen sich ebenfalls durch Vergleich, z.B. mit 2,3,-5-Trichlorphenol, zuordnen [80].

	Aminosäureanteil			
Name	COOH COOR	C	C	C
L-Glu-OH	175,6 182,3	55,7	26,1	34,5
L-Glu(Bzl)OH	180,89 182,47	59,10	26,01	30,38
Boc-L-Glu(Bzl)OH	171,0 172,5	52,6	26,45	30,15
Z-Glu(OtBu)OCP	169,82 171,46	53,25	25,93	30,97

	Schutzgruppen					
Name	C=O	OBzl CH_2	C_6H_5	t-Boc o. OBut	CH_3	
L-Glu-OH						
L-Glu(Bzl)OH		64,63	128,19 128,55 129,47 141,21			
Boc-Glu(Bzl)OH	154,4	66,05	126,8 127,0 127,45 135,35	77,6	28,05	
Z-Glu(OtBu)OCP	156,28	65,88	125,68 127,81 127,99 131,21	80,03	27,82	130,72 128,41 125,68

Tabelle 6: ^{13}C-NMR-chemische Verschiebungen von Glutaminsäure und Derivaten. Die ppm-Werte sind auf TMS = 0 bezogen. Glutaminsäure wurde in D_2O, die anderen Verbindungen in DMSO gemessen.

1.7. Methionin und Derivate

Die ppm-Werte von L-Met-OH wurden bereits früher veröffentlicht [81] und eine pH-Abhängigkeit einer wässrigen Methioninlösung durchgeführt. Hieraus lassen sich aus den verschiedenen Ladungsdichten an den verschiedenen C-Atomen indirekte Rückschlüsse auf den Einfluß des Schwefels auf das Gesamtmolekül ziehen.

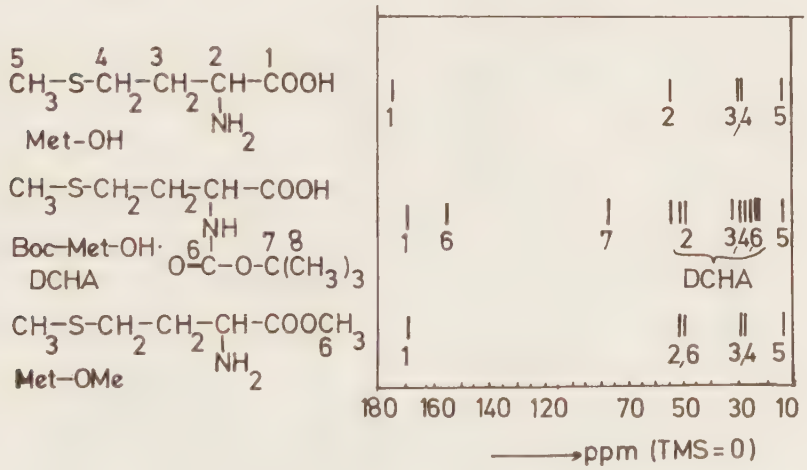


Abb. 24: ^{13}C-NMR-Strichspektrum von Methionin und Methioninderivaten.

Die ppm-Werte der Carboxylgruppe liegen zwischen 175,30 und 169,50. Die ^{13}C-chemische Verschiebung der Derivate lassen sich durch Vergleich mit der Stammverbindung zuordnen.

Die Signale für die DCHA-Gruppe von Boc-L-Met-DCHA-Salz lassen sich durch Vergleich dieses Spektrums mit dem ^{13}C-Spektrum von Dicyclohexylamin zuordnen.

	Aminosäureanteil				
Name	COOH COOR	C	C	C	C
L-Met-OH	175,30	55,30	31,00	30,10	15,20
L-Met-OMe	169,50	52,75	29,25	28,40	14,20
Boc-L-Met . DCHA	173,71	51,79	29,99	28,37	14,78

	Schutzgruppen				
Name	C = O	t-Boc	CH_3	O-CH_3	DCHA
L-Met-OH					
L-Met-OMe				50,80	
Boc-L-Met . DCHA	155,04	77,58	28,27		54,49 32,69 25,15 24,28

Tabelle 7: ^{13}C-NMR-chemische Verschiebungen von Methionin, Methioninmethylester und Boc-L-Met.DCHA-Salz. Die ppm-Werte sind auf TMS = 0 bezogen. Methionin wurde in D_2O, Methioninmethylester und das DCHA-Salz in DMSO gemessen.

1.8. Serin und Derivate

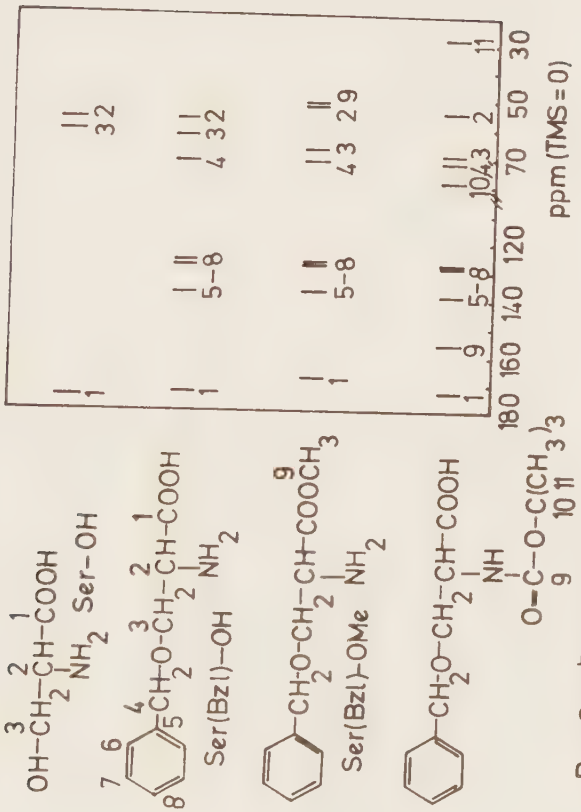


Abb. 25: ^{13}C-NMR-Strichspektrum von Serin und Derivaten. Die ppm-Werte sind auf TMS = 0 bezogen.

Die chemischen Verschiebungen von Serin liegen für das C-2-Atom zwischen 52,75 und 58,05 ppm, C-3 zwischen 61,30 und 69,70 ppm. Im aromatischen Bereich findet man drei verschiedene Signale, die dem Benzylrest im Boc-L-Ser(Bzl)-OH zugeordnet werden können.

	Aminosäureanteil		
Name	COOH COOR	C	C
L-Ser-OH	173,85	57,40	61,30
L-Ser(Bzl) OH	172,85	58,05	63,45
L-Ser(Bzl) OMe	168,15	52,75	67,45
Boc-L-Ser (Bzl)OH	172,20	54,05	69,70

	Schutzgruppen					
Name	C=O	CH_3	C_6H_5	t-Boc	CH_3	OCH_3
L-Ser(Bzl)-OH		72,55(4)	138,14 128,55 127,10			
Boc-L-Ser (Bzl)-OH	155,60(9)	72,40(4)	138,30 128,40 127,65	78,54(10)	28,40(11)	
L-Ser(Bzl) OMe.HCl		72,30(4)	137,55 128,30 127,65			52,50

Tab. 8: ^{13}C-NMR-chemische Verschiebungen von Serin und Derivaten. L-Ser-OH wurde in D_2O, die übrigen Verbindungen in DMSO gemessen.

1.9. Tyrosin und Derivate

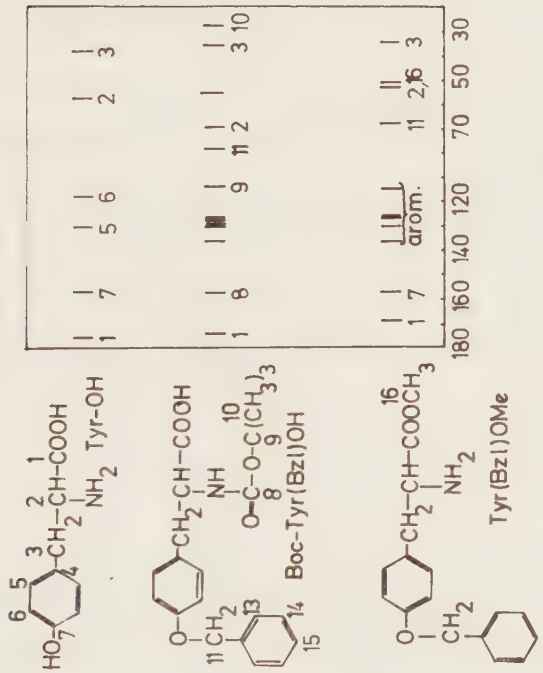


Abb. 26: ^{13}C-NMR-Strichspektren von Tyrosin und Derivaten

Bei den Tyrosinderivaten erfolgt die Signalzuordnung der C-Atome des nichtaromatischen Aminosäurerestes durch Vergleich mit dem Spektrum der Stammverbindung [74]. Im Spektrum von Boc-L-Tyr-(Bzl)-OH und L-Tyr(Bzl)-OMe werden

folgende Zuordnungen getroffen: Im Aromatenbereich von 137,20 bis 113,65 ppm liegen 6 Resonanzen, die durch Absorption von 7 verschiedenen C-Atomen entstehen. Eindeutig sind durch spektrale Vergleiche die Resonanzen der Boc-Gruppe und der -O-CH_3-Gruppe des Esters zu identifizieren.

	Aminosäureanteil			
Name	COOH COOR	C	C	$C_{arom.}$
L-Tyr-OH	175,00(1)	57,30(2)	37,50(3)	117,50(6) 130,50(5) 156,30(7)
Boc-L-Tyr (Bzl)-OH	173,80(1)	55,55(2)	35,70(3)	113,65 126,6 126,8 127,45 129,25 136,3
L-Tyr(Bzl) OMe	169,40	53,50	34,90	157,65(7) 137,20 130,65 128,45 127,65 114,90

	Schutzgruppen					
Name	C=O	CH_2	C_6H_5	C-t.Boc	CH_3	OCH_3
Boc-L-Tyr (Bzl)-OH	157,10(8)	69,25(11)	113,65 126,6 126,8 127,45 129,25 136,3	78,10(9)	28,25(10)	
L-Tyr(Bzl) OMe		69,25	157,65 137,20 130,65 128,45 127,65 114,30			52,45

Tab. 9: ^{13}C-NMR-chemische Verschiebungen von Tyrosin und Derivaten. Tyrosin wurde in D_2O, die anderen Verbindungen in DMSO gemessen

1.10. ^{13}C-NMR-Untersuchungen einiger Dipeptide

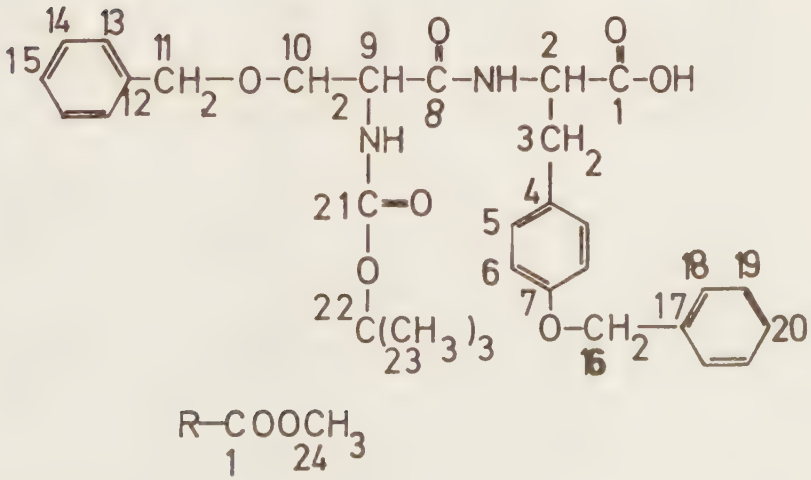
Für die Synthese von Peptiden werden Aminosäurederivate mit geschützten Amino- oder Carboxylgruppen eingesetzt. Hier soll gezeigt werden, daß die ^{13}C-NMR-Spektroskopie auch zur Synthesekontrolle dienen kann:

Boc-L-Ser(Bzl)-L-Tyr(Bzl)-OH (I)

Boc-L-Ser(Bzl)-L-Tyr(Bzl)-OMe (II)

Bei diesen beiden Dipeptiden lassen sich die nichtaromatischen Signale an Hand der Spektren der Serin- und Tyrosinderivate eindeutig zuordnen [74]. Die Zuordnung der aromatischen Signale ist auf Grund zweier Benzylschutzgruppen und der aromatischen C-Atome des Tyrosins nicht eindeutig zu treffen.

-



Name	AS	Aminosäureanteil			
		COOH COOR	C	C	$C_{arom.}$
Boc-L-Ser(Bzl)-	Ser	169,61	54,70	70,13	
L-Tyr(Bzl)-OH	Tyr	173,06	53,95	36,04	157,09
					138,32
					137,35
					130,55
					129,69
					128,50
					128,29
					127,64
					114,47
Boc-L-Ser(Bzl)-	Ser	169,99	54,46	70,12	
L-Tyr(Bzl).OMe	Tyr	171,75	53,72	36,06	157,30
					138,30
					137,33
					130,28
					129,13
					128,46
					128,22
					127,61
					114,68

Name	AS	Schutzgruppen					
		C=O	CH_2	C_6H_5	C_t	CH_3	OCH_3
Boc-L-Ser(Bzl)-	Ser	155,26	69,27	157,09	78,44	28,27	
L-Tyr(Bzl)-OH				138,32			
	Tyr			137,35			
				130,55			
				129,69			
				128,50			
				128,29			
				127,64			
				114,47			
Boc-L-Ser(Bzl)-	Ser		69,27		78,44	28,17	
L-Tyr(Bzl)-OMe	Tyr			157,30			51,78
				138,30			
				137,33			
				130,28			
				129,13			
				128,46			
				128,22			
				127,61			
				114,68			

Tab. 10: ^{13}C-NMR-chemische Verschiebungen von Serin-Dipeptiden. Die Verbindungen werden in DMSO gemessen (TMS = 0)

Boc-L-Arg(NO_2)-L-Trp-OH (I)
Boc-L-Trp-Gly-OMe (II)

Auch in diesen beiden Dipeptiden lassen sich die einzelnen Signale durch Spektralvergleich mit den Stammverbindungen identifizieren [74]. Allerdings müssen für die Zuordnung der Resonanzen im Aromatenbereich (136,26 bis 109,88) noch andere Vergleichssubstanzen herangezogen werden. Wie schon früher erwähnt, werden die aromatischen Signale von Tryptophan durch Vergleich mit 3-Methylindol zugeordnet.

		Aminosäureanteil					
Name	AS	COOH COOR	C	C	C	C	$C_{arom.}$
Boc-L-Arg(NO_2)-L-Trp-OH	Arg	175,33	54,88	28,83	25,01	42,19	
	Trp	171,14	54,55	29,26			135,99 128,04 123,42 120,45 118,75 117,90 111,11

		Schutzgruppen		
Name	AS	C = O	C_t	CH_3
Boc-L-Arg(NO_2)-L-Trp-OH	Arg	155,29	78,19	28,11

		Aminosäureanteil			
Name	AS	COOH COOR	C	C	$C_{arom.}$
Boc-L-Trp-Gly-OMe	Trp	170,39	54,37	25,06	136,26 127,62 118,52 111,50 109,88
	Gly	172,08	39,68		

Name	AS	Schutzgruppenanteil			
		C=O	C_t	CH_3	OCH_3
	Trp	155,57	78,55	28,37	
	Gly				51,90

Tabelle 11: ^{13}C-NMR-chemische Verschiebungen von Tryptophan-Derivaten. Die Verbindungen wurden in DMSO gemessen (TMS = 0)

2) Ionenaustauschchromatographische Trennung der Syntheseprodukte und Charakterisierung der isolierten Produkte

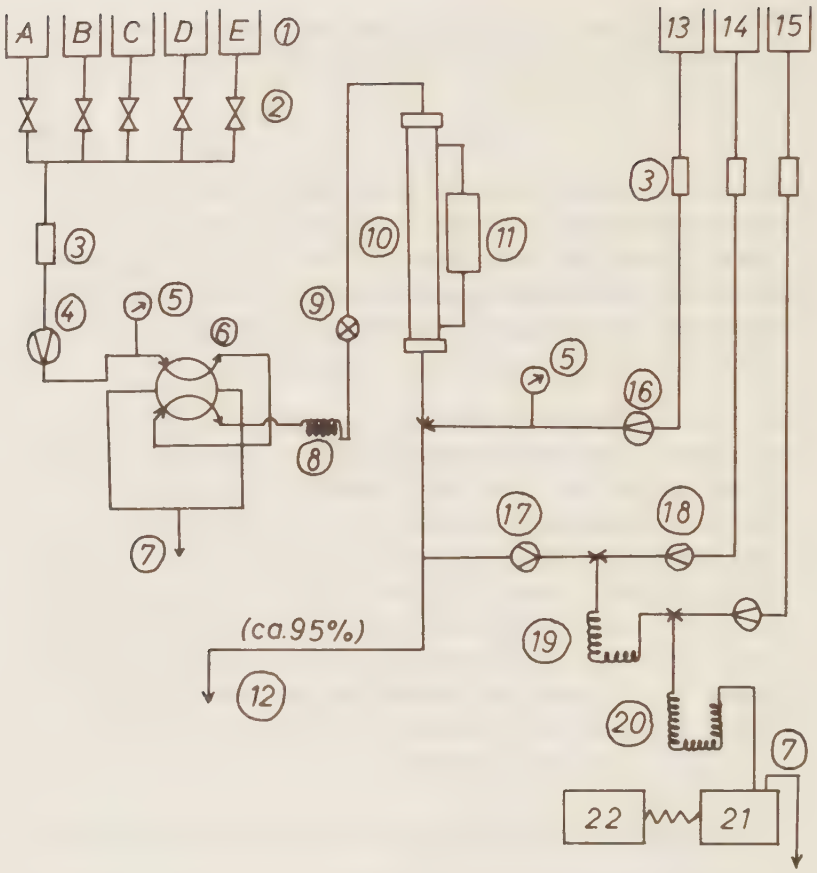
Bei den in dieser Arbeit angewandten Synthesestrategien entstehen zwangsläufig neben den erwünschten Hauptprodukten zahlreiche Nebenprodukte wie z.B. Fehlsequenzen durch unvollständige Kupplung, Rumpfsequenzen auf Grund sterischer Hinderung bei der Festphasensynthese und durch Racemisierung entstehende Diastereomere.

Um einen weitgehend objektiven Vergleich zwischen der klassischen und der Festphasenpeptidsynthese zu erhalten, wurden stets die direkt erhaltenen Syntheseprodukte zur Ionenaustauschchromatographie eingesetzt. Zur Erleichterung der Aufarbeitung der erhaltenen Fraktionen wurden Pyridin-Acetat-Puffer, die durch Lyophilisieren schonend entfernbar sind, als Elutionsmittel angewandt. Nur teilweise in Pyridin-Acetat-Puffer lösliche Reaktionsgemische wurden durch Zusatz von verdünnter Salzsäure, durch Erhöhung der Essigsäurekonzentration oder durch Zusatz von Cellusolve in Lösung gebracht.

a) Beschreibung des verwendeten Chromatographiesystems

Abbildung 27 zeigt das Blockschema des verwendeten Chromatographiesystems.

1) Puffervorratsgefäße; 2) el. Ventile; 3) Luftblasenfalle; 4) Pufferpumpe; 5) Manometer; 6) Probenaufgabeventil (Stop-flow); 7) Abfluß; 8) Probenschleife; 9) Probenaufgabeseptum; 10) Trennsäule; 11) Thermostat (40-45°C); 12) Fraktionssammler; 13) H_2O; 14) 5N NaOH; 15) Ninhydrin/Essigsäure; 16) Verdünnungspumpe; 17) Teilerpumpe; 18) NaOH-Pumpe; 19) Coil I (30m x 0,7mm PTFE); 20) Coil II (20m x 0,7mm PTFE); 21) Photometer (570 nm); 22) Schreiber.



Die Puffervorratsgefäße A bis E sind über elektrische Ventile (PTFE) und einer Luftblasenfalle mit einer Milton-Roy-Mikrodosierpumpe (1,5 ml/min) mit Manometer (0-100 bar) und einem 6 x 2-Wege Probenaufgabeventil mit Probenschleife (3,5 ml; 0,7 mm x 9 m PTFE) und Injektionsblock verbunden. Injektionsblock und eine thermostatisierbare zugentlastete Hochdruckchromatographiesäule (Glas) sind mit einem Teflonschlauch mit einem inneren Durchmesser von 0,3 mm verbunden. Die auf maximal 45° C thermostatisierte

Säule ist mit einem zu 8% quervernetzten stark sauren Polystyrol-Divinylbenzol-Ionenaustauscher (DC-1A) einer mittleren Korngröße von 18 ± 3 µm der Fa. Durrum, Palo Alto, USA gefüllt. Das von der Säule kommende Eluat wird mittels einer weiteren Mikrodosierpumpe mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:2 verdünnt, um den durch die Nachweisreaktion bedingten Substanzverlust zu verringern. Von diesem verdünnten Eluat wird durch eine modifizierte Pumpe mit verringertem Totvolumen ein kleiner Teil zur Detektion (0,2 ml/min) abgesaugt. Der Rest wird auf kürzestem Wege zu einem Fraktionssammler geleitet. Der zur Detektion bestimmte Anteil des Eluats wird mit 5 N Natronlauge (1:3) gemischt und in einer Reaktionscoil (20 m x 0,7 mm oder 40 m x 0,5 mm, PTFE) bei 100° C einer Partialhydrolyse unterworfen. Diese Partialhydrolyse war erforderlich, da stets ein geringer Anteil von Peptiden mit blockierter Aminofunktion nachweisbar war, der nicht mit Ninhydrin anfärbbar ist. Anschließend werden die so erhaltenen partiell hydrolisierten Peptidfraktionen mit einem mit Essigsäure versetzten Ninhydrinreagenz (1:1) gemischt. Der Farbstoff wird in einer 2. Reaktionscoil (20 m x 0,7 mm oder 30 m x 0,5 mm, PTFE) bei 100° C entwickelt, mit einem Biotronik-Photometer bei 570 nm vermessen und durch einen Schreiber aufgezeichnet. Alle mit den Elutionsmitteln und Reagenzien in Berührung kommenden Teile bestehen aus Edelstahl, Teflon oder Polypropylen. Sämtliche für die Trennung erforderlichen Schaltschritte (Pumpe, Ventile, Teilerpumpe) werden durch 5 in Reihe geschaltete Zeituhren gesteuert. Alle zur Detektion notwendigen Funktionen (NaOH-Pumpe, Ninhydrinpumpe und Schreiber) werden durch eine getrennte Zeitschaltuhr gesteuert.

Der Verlust durch die Detektion beträgt 4,4%, bzw. 95,6% des Eluats und damit der aufgetrennten Peptide gelangen in den Fraktionssammler.

Bauteile, Chemikalien und Reagenzien:

α) Trennharz: Als Säulenfüllmaterial wird ein stark saurer, zu 8% quervernetzter Polystyrol-Divinylbezol-Ionenaustauscher (DC-1A der Fa. Durrum, Palo Alto, USA) eingesetzt. Der Ionenaustauscher wurde vor dem Packen der Säule in die Pyridinium-Form überführt.

β) Elutionspuffer: Es werden wässrige Pyridinacetat-Puffer verschiedener Molarität und pH-Werte angewandt:

A: 0,2 m an Pyridin, pH = 3,4
B: 0,5 m an Pyridin, pH = 4,25
C: 1,0 m an Pyridin, pH = 5,0
D: 4,0 m an Pyridin, pH = 5,6 (gleichzeitig Regenerierpuffer)

Die Puffer werden hergestellt, indem Pyridin, das zunächst über KOH und dann mindestens 3 x über Ninhydrin destilliert wurde, um durch Ninhydrin anfärbbare Anteile zu entfernen, in H_2O gelöst wird und der pH-Wert durch Zugabe von ebenfalls destillierter Essigsäure eingestellt wird.

γ) Ninhydrinreagens: Das nach den Angaben von Stein und Moore hergestellte Reagens [82] wird mit Essigsäure im Verhältnis 1:1 gemischt.

b) Diskussion und Auswertung der erhaltenen Chromatogramme

α) Produkte klassischer Synthesen

Abb. 28 : Chromatogramm von 125 mg eingesetztem Rohprodukt des Dipeptidis L-Arg-L-Trp-OH

Peak	gef. Aminosäure	isolierte Menge (mg)	isolierte Menge (%)
1	Arg, Trp	9,29	7,4
2	- , -	-	-
3	Arg, Trp	87,84	70,27
4	Arg, Trp	5,00	4,00
5	- , -	-	-
6	Arg, -	0,09	0,072
7	Arg, -	1,88	1,50
		104,10	83,24

Das Dipeptid wird nach der DCCI-Methode [27,28] aus Boc-L-Arg(NO_2)-OH und L-Trp-OMe dargestellt. Anschließend wird durch Verseifung die freie Säuregruppe zurückgewonnen und mit Bortristrifluorätherat in Eisessig die Boc- bzw. die Nitro-Gruppe am L-Arginin entfernt [39]. Das erhaltene Rohprodukt wird der Chromatographie unterworfen. Nach Aminosäureanalyse und Elementaranalyse entsprach der Peak 3 dem gewünschten Dipeptid. Die Fraktionen 1 und 4 hatten ebenfalls die beiden Aminosäuren Arginin und Tryotophan, allerdings nicht in dem gewünschten Verhältnis 1:1. Fraktion 2 enthielt keine der gesuchten Aminosäuren, während Peak 6 und 7 jeweils in geringen Mengen nur Arginin enthielten. Das Felddesorptionsspektrum von 3 ergab den erwarteten Massenpeak von 361.

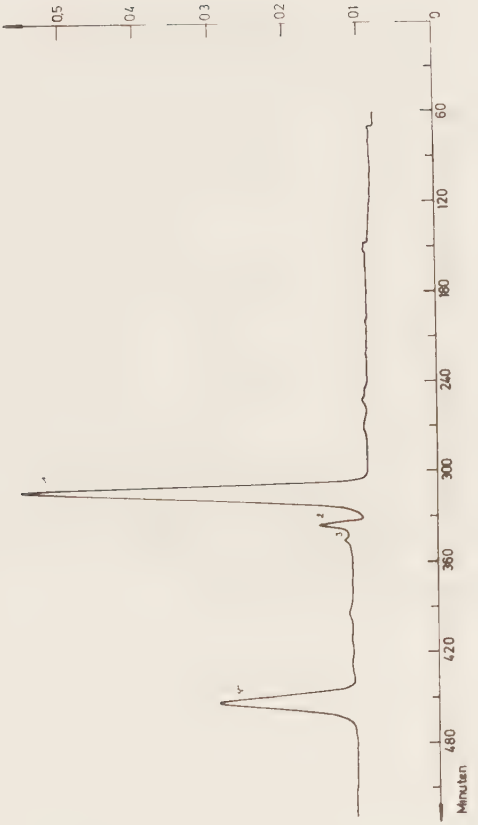


Abb.29 : Chromatogramm des Tripeptids L-Arg-L-Trp-Gly-OH.
Eingesetzte Menge: 150 mg Rohprodukt

Peak	gef. Aminosäure	isolierte Menge (mg)	isolierte Menge (%)
1	Arg, Trp, Gly	82,04	54,69
2	Arg, Trp, Gly	39,71	26,47
3	Arg, Trp, Gly	7,80	5,20
4	Arg, Trp, Gly	13,64	9,09
		143,19	95,45

Bei der Synthese des Tripeptids L-Arg-L-Trp-Gly-OH durch DCCI-Kupplung aus Boc-L-Arg(NO_2)-L-Trp-OH und Gly-OMe wurden nach Abspaltung der Schutzgruppen durch Verseifung und Behandlung mit Bortristrifluorätherat [39] 95,45% des zur Chromatographie eingesetzten Rohprodukts wiedergefunden, wobei der Peak 1 dem gewünschten Tripeptid entsprach. Zwar konnten auf Grund der Aminosäureanalysen auch den Fraktionen 2 - 4 die gesuchten Aminosäuren Arginin, Tryptophan und Glycin zugeordnet werden, aber nur im Falle der Fraktion 1 entsprach die Zusammensetzung dem gewünschten freien Peptid. Bei den Peptiden 2 - 4 waren teilweise die Gruppe des Methylesters bzw. die Nitrogruppe bei der Abspaltung erhalten geblieben. Dies konnte auf Grund der Elementaranalyse und eines FD-Spektrums nachgewiesen werden. Charakteristisch für das freie Peptid ist der Massenpeak 418 bzw. 419. Der Massenpeak von 463 entspricht dem Nitropeptid L-Arg(NO_2)-L-Trp-Gly-OH.

-

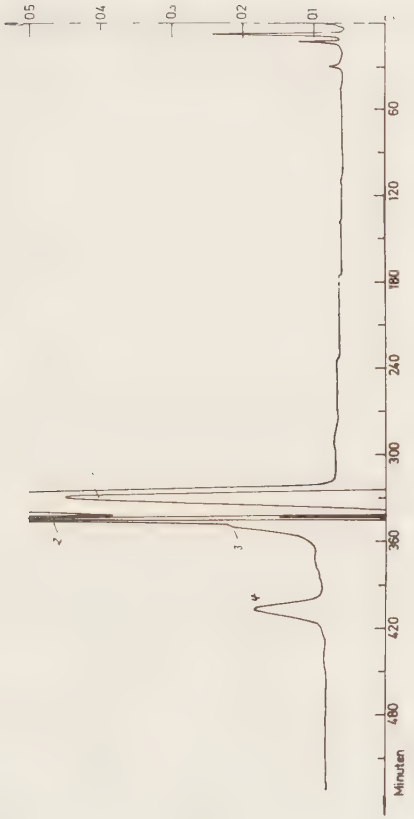


Abb. 30: Chromatogramm des Tetrapeptids
L-Phe-L-Arg-L-Trp-Gly-OH

Peak	gef. Aminosäuren	isolierte Menge (mg)	isolierte Menge (%)
1	Phe, Arg, Trp, Gly	57,12	57,12
2	Phe, Arg, Trp	26,88	26,88
3	Phe, Arg, Gly	2,65	2,65
4	Phe, Arg, Trp, Gly	1,95	1,95
		88,60	88,60

Das Tetrapeptid L-Phe-L-Arg-L-Trp-Gly-OH wurde durch Kupplung von Boc-L-Phe mit L-Arg(NO_2)-L-Trp-Gly-OMe synthetisiert. Die Abspaltung der Boc-Gruppe des Tripeptids Boc-L-Arg(NO_2)-L-Trp-Gly-OMe wurde durch IR-Spektroskopie nachgewiesen (Abb. 9).
Durch Aminosäureanalyse konnte nachgewiesen werden, daß lediglich die Fraktionen 1 und 4 des Rohproduktes die komplette Zahl der Aminosäuren Phenylalanin, Arginin, Tryptophan und Glycin enthielten. Bei Peak 2 fehlte Glycin, bei Peak 3 Tryptophan. Insgesamt konnten 88,60% des eingesetzten Rohproduktes nach der chromatographischen Trennung wiedergefunden werden. Auf Grund der Aminosäureanalyse und der CH-Analyse konnte der Peak 1 als Tetrapeptid Phe-Arg-Trp-Gly-OH charakterisiert werden.

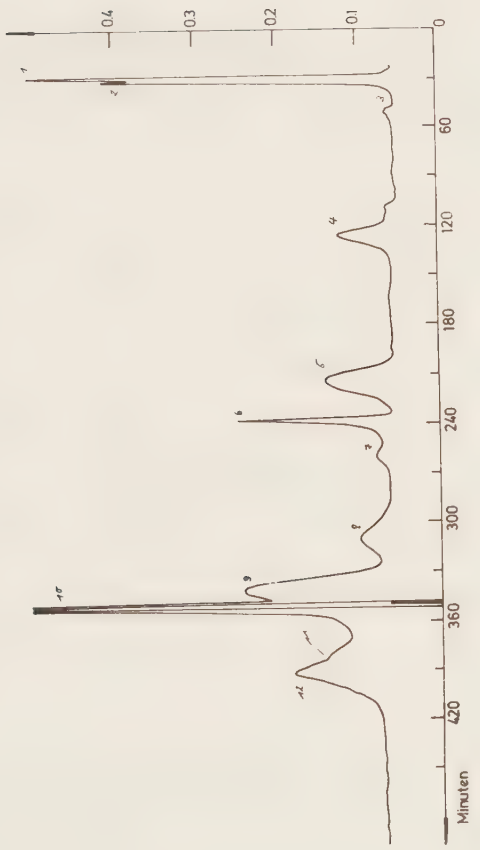


Abb. 31 : Chromatogramm des Hexapeptids L-Glu-L-His-L-Phe-L-Arg-L-Trp-Gly-OH

Peak	gef. Aminosäuren	isolierte Menge (mg)	isolierte Menge (%)
1	Glu, His, Phe, Arg, Gly	4,59	1,84
2	Glu, Phe, Arg, Trp, Gly	5,09	2,04
3	Gly	0,3	0,12
4	Glu, His, Arg, Gly	1,39	0,56
5	Glu, His, Phe, Arg, Trp, Gly	14,90	5,96
6	Glu, His, Phe, Arg, Trp, Gly	35,70	14,28
7	Glu, His, Phe, Arg, Gly	0,77	0,31
8	Glu, His, Arg, Trp, Gly	1,08	0,43
9	Glu, His, Phe, Arg, Trp, Gly	27,10	10,84
10	Glu, His, Phe, Arg, Trp, Gly	139,24	55,70
11	His, Phe, Arg, Gly	1,80	0,72
12	Glu, His, Phe, Arg, Gly	3.47	1,39
	Total	235,43	94,19

Das Hexapeptid L-Glu-L-His-L-Phe-L-Arg(NO_2)-L-Trp-Gly-OH wurde besonders gut untersucht, da es zur Synthese des Decapeptids L-Ser-L-Tyr-L-Ser-L-Met-L-Glu-L-His-L-Phe-L-Arg-L-Trp-Gly-OH eingesetzt wurde. Die Kupplung erfolgte aus dem Dipeptid Z-L-Glu(OtBu)-L-His-OMe mit L-Phe-L-Arg(NO_2)-L-Trp-Gly-OMe.

Zuerst wurde das Hexapeptid einer Aminosäureanalyse unterworfen, um die Anwesenheit aller gewünschten Aminosäuren zu sichern. Nach der Abspaltung der Schutzgruppen wurde das Rohprodukt einer ionenaustauschchromatographischen Trennung unterworfen (s. Abb. 16). Von den gefundenen Fraktionen enthielten die Fraktionen 5, 6, 9 und 10 alle gewünschten Aminosäuren. Fraktion 10 wurde einer FD-Messung

unterworfen. Die gefundenen Massenwerte entsprachen der gewünschten Sequenz des Hexapeptids. Die aus dem Rohprodukt nach der Trennung isolierte Ausbeute betrug 94,19%.

Abb. 32 : Chromatogramm des Tetrapeptids
L-Ser-L-Tyr-L-Ser-L-Met-OH

Peak	gef. Aminosäuren	isolierte Menge (mg)	isolierte Menge (%)
1	Ser, Tyr, Met	19,36	19,36
2	Ser, Met	7,27	7,27
3	Tyr, Met	1,64	1,64
4	Ser, Tyr, Met	0,88	0,88
5	Ser, Tyr, Met	44,80	44,80
		73,95	73,95

Das Tetrapeptid L-Ser-L-Tyr-L-Ser-L-Met-OH wurde, wie im experimentellen Teil beschrieben, synthetisiert, die Schutzgruppen nach der Verseifung mit HBr/Trifluoressigsäure abgespalten [33]. Hierauf wurde das Rohprodukt aufgetrennt und mit 73,95 % wiedergewonnen. Von den gefundenen fünf Peptiden enthielt lediglich Fraktion 5 des Chromatogramms das komplette Peptid.
Fraktion 1 enthielt zwar alle gewünschten Aminosäuren, doch waren die Schutzgruppen nicht völlig abgespalten. Fraktion 2 bzw. 3 enthielt jeweils nur zwei Aminosäuren, nämlich Serin und Methionin bzw. Tyrosin und Methionin. Bei Fraktion 4 ergab sich bei der Aminosäureanalyse lediglich ein Serin an Stelle von zwei im gewünschten Peptid auf die restlichen Aminosäuren.

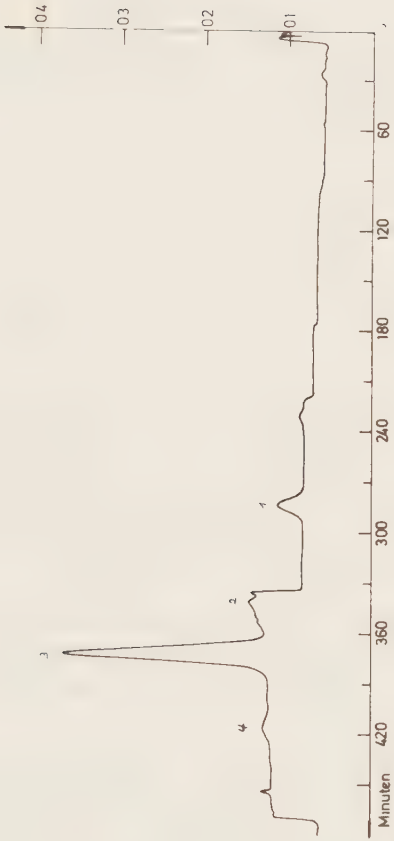


Abb. 33 : Chromatogramm des Pentapeptids
L-His-L-Phe-L-Arg-L-Trp-Gly-OH

Peak	gef. Aminosäuren	isolierte Menge (mg)	isolierte Menge (%)
1	Phe, Gly	1,57	3,92
2	Arg, Trp, Gly	1,70	4,25
3	His, Phe, Arg, Trp, Gly	24,69	61,72
4	His, Phe, Arg, Trp, Gly	1,55	3,87
		29,51	73,76

Dieses Peptid wurde über das Dipeptid Z-L-His-L-Phe-OMe und das Tripeptid Boc-L-Arg(NO_2)-L-Trp-Gly-OMe nach der Abspaltung der Boc-Schutzgruppe vom Tripeptid mittels der Azidmethode gekuppelt [16,17]. Die Schutzgruppen vom Pentapeptid wurden durch Verseifung und Hydrierung entfernt.

Bei der anschließenden Auftrennung des Rohproduktes wurden Teil- und Rumpfsequenzen gefunden, wie auch Derivate, bei denen die Schutzgruppen nicht vollständig abgespalten waren.
Diese Befunde wurden in diesem Fall durch Aminosäureanalyse und CH-Analyse nachgewiesen. Das erwünschte Peptid war in der Fraktion 3. Vom eingesetzten Rohprodukt konnten bei der Trennung 73,76 % wiedergewonnen werden.
Ein FD-Spektrum der Fraktion 3 ergab den gewünschten Massenpeak von 702.

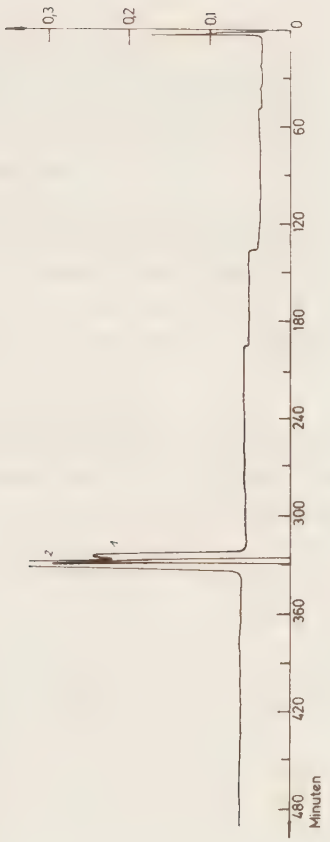
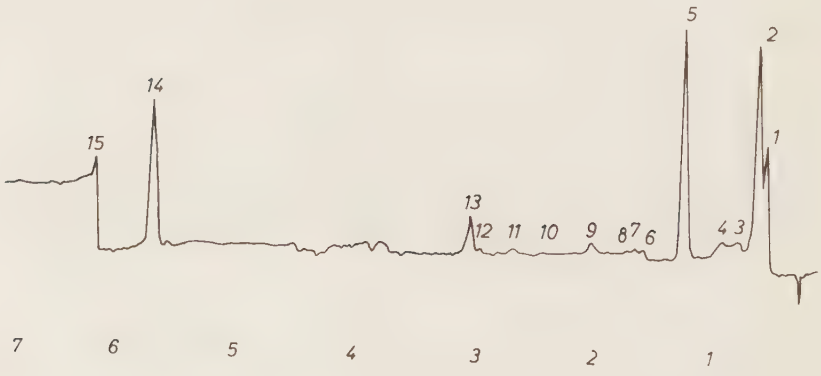


Abb. 34: Chromatogramm des Dipeptids L-His-L-Phe-OH
Eingewogene Menge 30 mg

Peak	gef. Aminosäuren	isolierte Menge (mg)	isolierte Menge (%)
1	His, Phe	3,00	10,00
2	His, Phe	16,02	53,40
		19,02	63,40

Das Dipeptid L-His-L-Phe-OH wurde nach der Azidmethode [16,17] aus Z-L-His-NH-NH_2, das aus dem Methylester synthetisiert wurde und aus L-Phe-OMe dargestellt. Nach der Verseifung und Hydrierung wurden 30 mg Rohprodukt chromatographisch aufgetrennt. Die Fraktion 2 erwies sich als das gewünschte Dipeptid, wie sich aus Elementaranalyse und Aminosäureanalyse ergab. Fraktion 1 hatte zwar ebenfalls die erwünschte Zusammensetzung der Aminosäuren, jedoch stimmte die Elementaranalyse nicht mit den erwarteten Werten überein.

Abbildung 35: Chromatogramm des Decapeptids L-Ser-L-Tyr-L-Ser-L-Met-L-Glu-L-His-L-Phe-L-Arg-L-Trp-Gly-OH
Eingewogene Menge 50 mg



Peak	gefundene Aminosäuren									mg	%
	Ser	Tyr	Met	Glu	His	Phe	Arg	Trp	Gly		
1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	2,10	4,2
2	-	-	-	-	-	+	+	-	+	4,20	8,4
3	+	+	-	+	-	+	+	-	+	0,75	1,52
4	-	-	-	-	-	+	+	-	+	0,91	1,82
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	5,35	10,7
6	+	+	+	+	+	+	+	-	+	0,32	0,64
7	+	+	+	+	+	+	+	-	+	0,52	1,04
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,21	0,42
9	+	+	+	+	+	+	+	-	+	0,85	1,7
10	+	+	-	+	+	+	+	-	+	0,25	0,51
11	+	+	+	+	-	+	+	-	+	0,33	0,66
12	+	-	+	+	+	+	+	-	+	0,93	1,86
13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1,90	3,80
14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	26,20	52,38
15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1,84	3,68

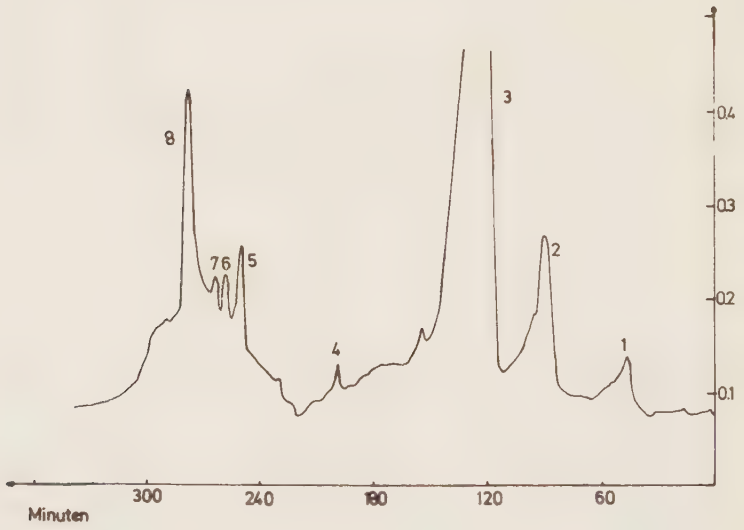
Das Decapeptid L-Ser-L-Tyr-L-Ser-L-Met-L-Glu-L-His-L-Phe-L-Arg-L-Trp-Gly-OH wurde nach dem in Abbildung 16 gezeigten Schema synthetisiert. Alle bei der chromatographischen Trennung erhaltenen Fraktionen wurden auf ihre Zusammensetzung untersucht. Obige Tabelle zeigt die in den jeweiligen Fraktionen gefundenen Aminosäuren. Die Fraktionen 5, 8, 13, 14 und 15 enthielten alle Aminosäuren. Peak 5 enthielt auf Grund der Analyse einen Überschuß an Serin. Die Fraktionen 8, 13 und 15 erwiesen sich als teilgeschützte Decapeptide, während die Fraktion 14 auf Grund von Elementaranalyse, Schmelzpunkt und FD-Messung als das gewünschte Decapeptid charakterisiert werden konnte.

ß) Produkte nach der Merrifield-Methode

Alle Merrifield-Produkte wurden mit dem gleichen Chromatographie-System wie die klassischen Produkte getrennt. Es werden lediglich andere Elutionspuffer verwendet:

A: 0,2 m an Pyridin, 57,0% Eisessig
B: 0,6 m an Pyridin, 38,0% Eisessig
C: 1,0 m an Pyridin, 16,0% Eisessig
D: 4,0 m an Pyridin, 36,0% Eisessig

Abb. 36: Chromatogramm des Tetrapeptids L-Ser-L-Tyr-L-Ser-L-Met-OH



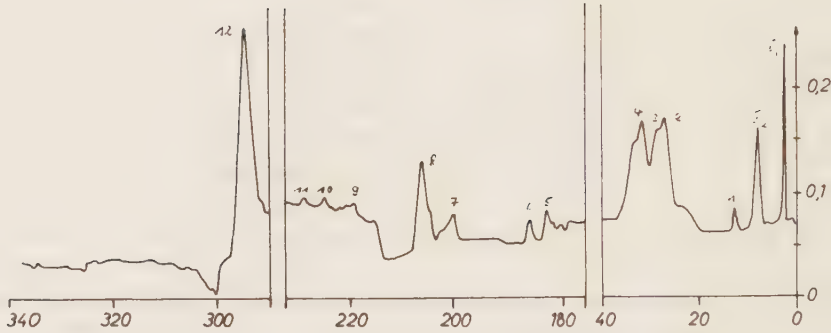
Bei den Merrifield-Produkten konnten auf Grund der geringeren Substanzmengen nur von den größeren Peaks Untersuchungen vorgenommen werden. Bei diesem Tetrapeptid konnten nach der Abspaltung vom Harz insgesamt acht Fraktionen

aus dem Rohprodukt isoliert werden. Von diesen Fraktionen erwies sich der mit 3 bezeichnete Peak als das gewünschte Tetrapeptid mit der gewünschten Frequenz L-Ser-L-Tyr-L-Met-OH. Die restlichen Fraktionen enthielten entweder teilgeschützte Tetrapeptide, oder Rumpfsequenzen.

Peak	gef. Aminosäuren
1	Met
2	Ser, Met
3	Ser, Tyr, Met
4	Tyr, Met
5	Ser, Tyr
6	Ser, Tyr, Met
7	Ser, Tyr, Met
8	Ser, Tyr, Met

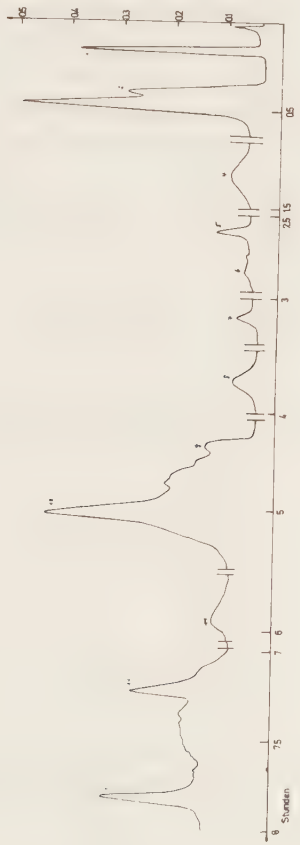
Insgesamt wurden 50 mg Rohprodukt zur chromatographischen Trennung eingesetzt und hiervon 35,8 % als gewünschtes Tetrapeptid isoliert.

Abb. 37: Chromatogramm des Pentapeptids L-His-L-Phe-L-Arg-L-Trp-Gly-OH



Auch hier wurde lediglich der Hauptpeak untersucht, während die kleineren Fraktionen lediglich auf ihre Aminosäurezusammensetzung durch Aminosäureanalyse kontrolliert wurden. Der Hauptpeak (69,3 % des eingesetzten Rohproduktes) erwies sich in reinen charakteristischen Daten als identisch mit dem Produkt der klassischen Synthese. Alle anderen Fraktionen enthielten entweder nicht alle gewünschten Aminosäuren oder teilweise geschützte Peptide.

Abb. 38: Chromatogramm des Hexapeptids L-Glu-L-His-L-Phe-L-Arg-L-Trp-Gly-OH

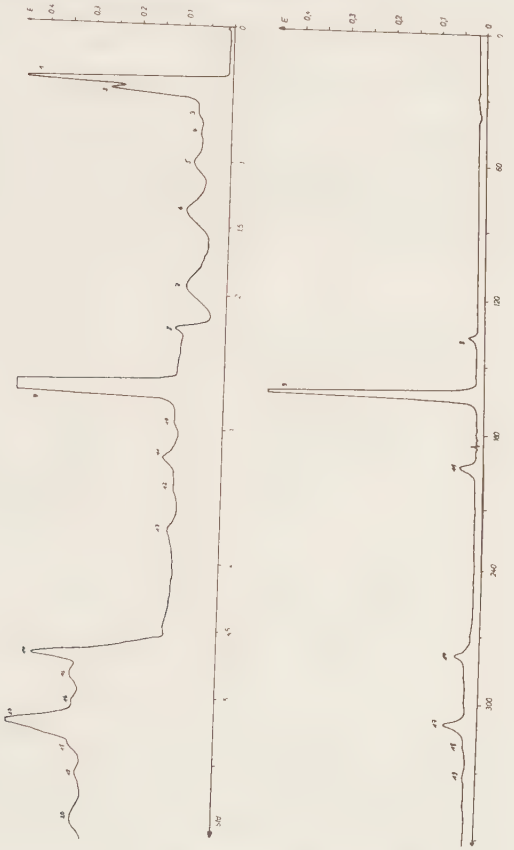


Dieses Hexapeptid wurde genauer untersucht, da das entsprechende klassische Produkt zur Kupplung zum Decapeptid Verwendung fand. Hier wurden auch die kleineren Fraktionen auf ihre Zusammensetzung untersucht. Das HPLC-Spektrum ergab insgesamt 13 Fraktionen. Die Fraktion 1 enthielt nichtumgesetztes Glycin, bzw. im Verlauf der Synthese freigebliebenes Harz mit der ersten Aminosäure. Die Fraktionen 2 und 3 waren Sequenzen, bei denen im einen Fall die Amino-

säure Histidin, im anderen die Aminosäuren Phenylalanin und Glutaminsäure fehlten. Die Fraktionen 4 - 9 waren in ihren Mengen so gering, daß sie nicht weiter untersucht wurden. Peak 10 enthielt alle gekuppelten Aminosäuren, aber die Aminosäureanalyse ergab einen Überschuß an Arginin. Auf Grund der Vergleichswerte mit dem klassischen Produkt konnte schließlich die Fraktion 13 mit einer Ausbeute von 76,4 %, bezogen auf die Einwaage an Rohprodukt, als das gewünschte Hexapeptid L-Glu-L-His-L-Phe-L-Arg-L-Trp-Glu-OH charakterisiert werden.

Peak	gef. Aminosäure
1	Gly
2	Glu, Phe, Arg, Trp, Gly
3	His, Arg, Trp, Gly
4	---
5	---
6	---
7	---
8	---
9	---
10	Glu, His, Phe, Arg, Trp, Gly
11	Glu, His, Arg, Trp, Gly
12	Arg, Trp, Gly
13	Glu, His, Phe, Arg, Trp, Gly

Abb. 39: Chromatogramm des Decapeptids L-Ser-L-Tyr-L-Ser-L-Met-L-Glu-L-His-L-Phe-L-Arg-L-Trp-Gly-OH mit und ohne Partialhydrolyse



Das Rohprodukt des Decapeptids wurde einmal mit und einmal ohne Partialhydrolyse chromatographisch getrennt. Hierdurch wurde die Zahl der möglichen Fraktionen für das freie Decapeptid von 20 Fraktionen auf 7 Fraktionen verringert. Bei den verbliebenen Fraktionen handelte es sich eindeutig um Ninhydrin-positive Peptide. Dabei erwies sich die Fraktion 9 als das gewünschte Decapeptid, das auf Grund

der Aminosäureanalyse und seiner physikalisch-chemischen Daten charakterisiert werden konnte. Der nach der Trennung mit Partialhydrolyse verbleibende Peak 11 enthielt lediglich die Aminosäuren Serin, Glutaminsäure, Glycin, Arginin und Phenylalanin. Die Fraktionen 14 und 17 enthielten die Aminosäuren Serin, Glutaminsäure, Glycin, Tyrosin und Phenylalanin, wobei in Peak 14 Serin und Tyrosin im Überschuß vorhanden waren. Bei Fraktion 17 kam zusätzlich Histidin hinzu. Die Fraktionen 8, 18 und 19 wurden auf Grund der geringen Substanzmengen nicht weiter untersucht.

C. EXPERIMENTELLER TEIL

I. Allgemeine Arbeitsverfahren

1. Geräte

In dieser Arbeit wurden folgende Geräte verwendet:

a) pH-Meter Typ 512, Impulsomat E 473 mit Glaselektrode der Firma Metrohm Herisau, Schweiz
b) Fraktionssammler LKB 7000, Uvicord II und Peristaltikpumpe LKB der Firma LKB Produkter AB, Stockholm
c) Schmelzpunktsbestimmungsgerät nach Dr. Tottoli der Firma Büchi, Schweiz
d) Digitalpolarimeter OLD 5 der Firma Zeiß, Oberkochen (hierbei werden die α-Werte durch Extrapolation bestimmt)
e) Aminosäureanalysator Modell Unichrom der Firma Beckman Instrument
f) IR-Spektrograph Infracord der Firma Perkin-Elmer, Überlingen
g) CD-Geräte, Diograph II der Firma Roussel-Joan Frankreich und CD-Gerät Jasco J-20, Automatic Recording Spectro-Polarimeter, Japan

Zur ^{13}C-Messung wird ein HFX-90-Multikrom-NMR-Spektrometer (22,63 MHz für ^{13}C) verwendet. Die Impulsinterferrogramme werden in einem Fabritek 1074-Rechner (4 K) 1024-100 000 mal akkumuliert. Die Pulsbreite beträgt 5 Sek., das Pulsintervall 94 Sek. Zur Fourier-Transformation wird ein PDP-8-I-Rechner (4 K) verwendet.

Hexadeuterodimethylsulfoxid dient zur ^{2}H-Stabilisierung und als Lösungsmittel der Proben. Die Konzentration der Proben beträgt 100 - 300 mg/ml. Die Proben werden auf 30° temperiert. Die chemischen Verschiebungen sind auf Tetramethylsilan als Standard bezogen. Aus den Adressendifferenzen werden die chemischen Verschiebungen maschinell berechnet.

Die verwendeten L-Aminosäuren werden von der Firma E. Merck AG, Darmstadt, bezogen.
Die Dünnschichtchromatographieplatten (DC-Fertigplatten Kieselgel $60F_{254}$) sind ebenfalls Produkte der Firma E. Merck AG, Darmstadt.

2. Lösungsmittel

Die gebrauchten Lösungsmittel und Chemikalien werden nach den üblichen Methoden gereinigt und absolutiert.
Bei der Berechnung der Molekulargewichte werden folgende Atomgewichte benutzt:

C = 12,011; H = 1,008; O = 15,999; N = 14,007.

3. Produkttrennung

Die einzelnen Aminosäuren und Peptide werden je nach Reinigungsgrad durch Säulenchromatographie getrennt. Hierzu wurde bei den geschützten Peptiden LH 20, bei den freien Peptiden G 10 bzw. Ionenaustauschchromatographie angewendet.

4. Produktcharakterisierung

4.1. Aminosäureanalyse

Je nach Größe werden 2-5 µM Peptid in einer Ampulle mit 6N HCl bei 110° und Vakuum hydrolisiert. Dann zieht man das Lösungsmittel ab und löst in der entsprechenden Menge Puffer. Man trägt auf die Trennsäule des Analysators auf und wertet die Chromatogramme durch Vergleich mit Testgemischen aus.

4.2. Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie werden Kieselgelplatten mit und ohne Fluoreszenzindikator der Firma E. Merck AG, Darmstadt, verwendet.

4.3. Trennsysteme

A: Butanol/Eisessig/Wasser (3:1:1)
B: Chloroform/Methanol/Ammoniaklösung (25%) (60:45:20)
C: Methanol/Chloroform (2:1)
D: Chloroform/Methanol/Benzol/H_2O (40:40:40:5)

4.4. Anfärbereagenzien:

Ninhydrin-Lösung [83,84]
300 mg Ninhydrin werden in 100 ml n-Butanol und 3 ml Eisessig gelöst. Die Lösung wird im Kühlschrank aufbewahrt und als Sprühreagens verwendet.

Chlor-Tolidin-Lösung [85,86]
80 mg O-Tolidin, 15 ml Essigsäure und 0,55 g Kaliumjodid werden mit Wasser auf 250 ml aufgefüllt. Zur Entwicklung wird die angefeuchtete Dünnschichtplatte in eine Chlorkammer gestellt, danach belüftet und mit dem Reagens besprüht.

Sakaguchi-Reagens [87]
1. Lösung: 8-Hydroxychinolin (0,1% in Aceton)
2. Lösung: 0,2 ml Brom in 100 ml 0,5 n NaOH gelöst

Zunächst wird die Platte mit Lösung 1 und nach dem Trocknen mit Lösung 2 besprüht. Es treten bei positivem Ergebnis orangefarbene bis rote Flecken auf.

4.5. Spektroskopische Methoden

Die spektroskopischen Methoden werden in einem besonderen Abschnitt im allgemeinen Teil behandelt.

II. Aminosäurederivate

1. Darstellung von Boc-Azid [33-37]

In die auf 0° C gekühlte Lösung von 200 g (1,65 Mol) Carbazinsäure-tertiär-butylester (Boc-N_2H_3) in 176 g Eisessig wird 114,8 g (1,665 Mol) festes Natriumnitrit so zugegeben, daß die Temperatur zwischen 5° - 10° C bleibt. Anschließend werden 250 ml Wasser zugesetzt. Die gelbe Azidphase wird abgetrennt und die wässrige Phase viermal mit je 80 ml Äther extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden dreimal mit je 80 ml 1N $NaHCO_3$-Lösung und mit Wasser gewaschen. Dann wird über Na_2SO_4 getrocknet, abfiltriert und am Rotationsverdampfer bei 40° C im Wasserstrahlvakuum destilliert.

Ausbeute: 192 g Boc-Azid (86 % d.Th.)

MG: 143,15 $C_5H_9O_2N_3$

2. Darstellung von Benzyloxycarbonylchlorid (Z-Chlorid) [88]

In 1500 g (6,95 Mol) frisch destillierten Benzylalkohol werden bei -10° C bis -30° C unter starkem Rühren etwa 0,75 kg (7,6 Mol) Phosgen eingeleitet. Dann bringt man die Reaktionslösung langsam auf Zimmertemperatur und leitet für 24 Stunden Stickstoff ein, um die entstandene HCl und überschüssiges Phosgen zu entfernen. Die restliche HCl wird durch Evakuieren an der Wasserstrahlpumpe entfernt. Anschließend wird gut über Na_2SO_4 getrocknet. Eine Destillation ist nicht möglich, da sich hierbei der größte Teil des Z-Chlorids zersetzt.

Ausbeute: 1,17 kg (77 % d.Th.)

MG: 170,64 $C_8H_7O_2Cl$

3. Darstellung der Boc-Aminosäuren

Die Darstellung der Boc-L-Aminosäurederivate erfolgt ganz allgemein nach der pH-Stat-Methode von Schnabel [89].

Aminosäure-derivat	pH-Wert	Reaktions-dauer	Schmp.	
Gly	10,0	2,5	85- 87°	-
Trp	9,8	9,5	134-138°	-19,8 (C=1, HOAc)
Arg(NO_2)	9,8	24	121-125°	- 5 (C=1, DMF)
Phe	10,1	13,5	85- 88°	- 3,3 (C=1,14 HOAc)
His	9-9,5		154-157°	+16,4 (C=1, $CHCl_3$)
Glu(Bzl)	9,1	36	Öl	- 4,9 (C=1, MeOH)
Met	9,4	18	Öl	
Ser(Bzl)	9,4	15-20	58- 60°	+20,8 (EtOH)
Tyr(Bzl)	10	20	109°	+11 HOAc

Tab. 12 : Darstellung der Boc-L-Aminosäuren nach Schnabel

0,5 Mol der L-Aminosäure werden in einem Dioxan/Wasser-Gemisch suspendiert. Man gibt einen 10%-igen Überschuß an Boc-Azid hinzu und titriert am Autotitrator bei einem pH 9-11 (je nach Aminosäure) mit 4N NaOH [89]. Nachdem die Lösung klar und der pH konstant geworden ist, wird noch zwei Stunden weitergerührt. Danach wird ausgeäthert, um überschüssiges Boc-Azid zu entfernen. Zur Lösung wird ein Viertel ihres Volumens Essigsäureäthylester hinzugegeben. Man kühlt auf 0°-5° C ab und säuert mit 1N HCl oder 2n Citronensäure auf pH 2-3 an. Man trennt die Essigester-Phase ab, sättigt die wässrige Phase mit Kochsalz und extrahiert zweimal mit EE. Die EE-Phasen werden vereinigt, mit Wasser gewaschen und mit Kochsalz gesättigt. Man trocknet über Natriumsulfat, zieht das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer ab und fällt die Boc-Aminosäure mit Petroläther.

3.1. N-α-t-Butyloxycarbonyl-L-benzylserin
(Boc-L-Ser(Bzl)-OH)

a) α,ß-DiBrompropionsäureäthylester

In einem 2 Ltr. Dreihalskolben mit Rückflußkühler, Rührer und Tropftrichter werden 200 g (2 Mol) Acrylsäureäthylester in 200 ml trockenem Äther gelöst und langsam mit 120 ml Brom (Temp. ca. 5° C) versetzt. Das Reaktionsgemisch läßt man über Nacht stehen und fraktioniert dann im Vakuum.

Ausbeute: 492 g (95 % d.Th.)

Kp_{15}: 120° C Lit.Kp: 120-122° C [90)]

MG: 260 $C_4H_8O_2Br_2$

b) H-D,L-Ser(OBzl)-OH

Zu 492 g α,ß-Di-Brompropionsäureäthylester werden unter kräftigem Rühren bei 0° C innerhalb von 4 Stunden eine Lösung von 43,5 g Natrium in Benzylalkohol zugetropft. Anschließend wird noch eine Stunde lang weitergerührt. Zur Verseifung des Esters werden langsam unter Rühren und Eiskühlung 440 ml 5n NaOH-Lösung zugegeben. Zu dem Reaktionsgemisch gibt man 3 Ltr. Äther und trennt die wässrige Phase ab. Die Ätherlösung wird 4 mal mit je 200 ml H_2O ausgeschüttelt. Die vereinigten wässrigen Phasen werden unter Eiskühlung mit ca. 440 ml 5N H_2SO_4 angesäuert (pH = 2) und das ausgeschiedene Öl in 800 ml Äther aufgenommen. Die wässrige Lösung wird zusätzlich noch 2 mal mit je 100 ml Äther extrahiert. Die vereinigten Ätherextrakte werden mit H_2O säurefrei gewaschen und kurz mit $CaCl_2$ getrocknet. Man zieht den Äther ab und versetzt das zurückbleibende Öl mit 5 Ltr. conc. Ammoniak. Das Reaktionsgemisch bleibt 8-10 Tage stehen und wird täglich mit NH_3-Gas gesättigt. Danach wird filtriert und das Wasser am Rotationsverdampfer abgezogen. Der Rückstand wird mit Äther digeriert und abgenutscht. Das Gemisch aus O-Benzyl-

DL-Serin und NH_4Br wird aus H_2O umkristallisiert.
Ausbeute: 212 g (57 % d.Th.)
Schmp.: 218-219° C Schmp.Lit.: 218° C [90]
MG: 195,22 $C_{10}H_{13}O_3N$

Elementaranalyse:	C	H	N
ber. :	61,53	6,71	7,18
gef. :	61,48	6,82	7,11

c) Ac-D,L-Ser(OBzl)-OH

212 g (1,09 Mol) O-Benzyl-DL-Serin werden mit 540 ml 2N NaOH gelöst und die Lösung mit Eis gekühlt. Unter Rühren werden 160 ml Acetanhydrid und 1,045 l 2N NaOH gleichzeitig hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wird sofort durch Zugabe von 1N HCl auf pH = 2 eingestellt. Dabei scheidet sich O-Benzyl-N-Acetyl-D,L-Serin ab. Dieses wird abgesaugt, mit kaltem H_2O gewaschen und aus heißem H_2O mit Aktivkohle umkristallisiert.
Ausbeute: 152 g (52 % d.Th.)
Schmp.: 137° C Schmp.Lit.: 139-140° C [88]
MG: 238,26 $C_{12}H_{15}O_4N$

Elementaranalyse:	C	H	N
ber. :	60,75	6,37	5,90
gef. :	60,65	6,18	5,85

d) H-L-Ser(OBzl)-OH

Darstellung der Nierenacylase [91]

1 kg tiefgefrorene, frische Schweinenieren werden mit Wasser aufgetaut, in kleine Stücke geschnitten, vom Fett befreit, mit 1,5 l Eiswasser homogenisiert und 5 Minuten bei 7000 Upm und -5° C zentrifugiert. Die überstehende trübe Lösung wird im Eisbad auf 0° C gekühlt und mit 2N HCl auf pH 4,7 - 5,0 gebracht. Dann wird sofort bei 10 000 Upm zentrifugiert. Das dunkelrote Zentrifugat wird

in ein in einem Eisbad stehendes Becherglas gegeben und mit 2N NaOH auf pH = 6,5 gebracht. Die Lösung wird auf -30° C gebracht und pro Liter mit 266 g $(NH_4)_2SO_4$ innerhalb 20 Minuten versetzt. Nach 30 Minuten wird 5 Minuten lang bei 10 000 Upm zentrifugiert, der Rückstand in 40 ml Eiswasser suspendiert und weitere 10 Minuten zentrifugiert. Die dunkelrote Flüssigkeit wird über Nacht gegen Leitungswasser dialysiert. Dann wird von ausgefallenem Protein bei 7000 Upm zentrifugiert und die rotbraune Lösung mit stark verdünnter Essigsäure auf pH 6 gebracht. Man kühlt auf -2° C ab, gibt tropfenweise 0,2 Vol. Aceton - bezogen auf das Ausgangsvolumen - hinzu. Es wird noch einmal auf -5° C abgekühlt und die gleiche Menge Aceton hinzugegeben. Anschließend wird 5 Minuten bei 7000 Upm zentrifugiert. Die gelbe Lösung wird auf -5° bis -10° C abgekühlt und mit 0,6 Vol. Aceton - bezogen auf die Ausgangsmenge - tropfenweise versetzt. Anschließend wird 5 Minuten bei 7000 Upm zentrifugiert, der Rückstand in wenig Wasser aufgenommen und sofort gefriergetrocknet.
Ausbeute: 0,8 g.

ß) Racematspaltung

Zur Racematspaltung werden 20 g (0,084 M) N-Acetyl-O-Benzyl-D,L-Serin in 1 l bidestilliertem Wasser mit conc. Ammoniak in Lösung gebracht und mit HCl auf pH 7,2 eingestellt. Nach Zugabe von 540 mg Nierenacylase wird bei 37° C 24 Stunden lang gerührt und dann der pH nachgestellt. Dann wird weitere 2 Tage gerührt und aufgearbeitet [92]. Hierzu wird mit Essigsäure auf pH 4,5 gebracht, mit Aktivkohle gerührt und filtriert. Das Filtrat wird im Vakuum eingeengt, wobei das O-Benzyl-L-Serin in seidig glänzenden Blättchen auskristallisiert. Anschließend kristallisiert man aus heißem Wasser um.
Ausbeute: 5,2 g (70% d.Th.)
Schmp.: 213-214° C Schmp.Lit.: 213° C [93]

$[\alpha]_D^{20}$ = + 25,8 (c= 1,80% HAc + 1 Äqu.HCl)

$[\alpha]_D^{20}$ = + 26,9 (c= 1,80% HAc + 1 Äqu. HCl)

MG: 195,23 $C_{10}H_{13}O_3N$

Elementaranalyse:	C	H	N
ber.:	61,53	6,71	7,18
gef.:	60,98	6,54	7,23

R_F-Werte: A = 0,71
D = 0,32

N^{α}-t-Butyloxycarbonyl-L-benzylserin
(Boc-L-Ser(Bzl)-OH) [70]

Die Darstellung erfolgt nach der Vorschrift von E. Schnabel [89], Tabelle S.

Ausbeute: 5,12 g (82 % d.Th.)
Schmp.: 54° C Lit.Schmp.: 56-59° C [94]

$[\alpha]_D^{20}$ = + 20,4 (c= 1, MeOH = 1)

R_F-Werte: D = 0,79
MG: 295,34 $C_{15}H_{21}O_5N$

Elementaranalyse:	C	H	N
ber.:	61,00	7,17	4,74
gef.:	61,08	7,36	4,84

N^{α}-t-Butyloxycarbonyl-L-benzylserin-Dicyclohexylammoniumsalz

Boc-L-Ser(Bzl)-OH läßt sich nur sehr schwer aus Essigsäureäthylester und Petroläther kristallisieren. Deshalb wird das DCHA-Salz zur Produktreinigung hergestellt.

5 g Boc-L-Ser(Bzl)-OH werden in Äther gelöst und mit 4,2 g Dicyclohexylamin versetzt. Bei Zugabe von Petroläther kristallisiert das DCHA-Salz aus.

Ausbeute: 8 g (99 % d.Th.)

Schmp.: 133-135° C Lit.Schmp.: 135,5-136° C [95)]

$[\alpha]_D^{20}$ = + 22,9 (c=1, MeOH) $[\alpha]_D^{20}$ = + 24,3 (c=2,5, MeOH)

MG: 476,66 $C_{27}H_{44}O_5N_2$

Elementaranalyse:	C	H	N
ber.:	68,03	9,30	5,88
gef.:	68,10	9,19	5,92

Mittels der durch Zerlegung des DCHA-Salzes mit verdünnter Schwefelsäure erhaltenen Impfkristalle läßt sich dann bei späteren Synthesen Boc-L-Ser(Bzl)-OH, ohne Zwischenreinigung über das DCHA-Salz, in der Kälte leicht aus Essigsäureäthylester und Petroläther kristallisieren [94)].

3.2. N^{α}-t-Butyloxycarbonyl-L-benzyltyrosin (Boc-L-Tyr(OBzl)-OH)

O-Benzyl-L-tyrosin [96)]:

77,2 g (0,43 Mol) L-Tyrosin werden in 350 ml 2N NaOH gelöst, eine wässrige Lösung von 49,9 g $CuSO_4.5H_2O$ zugegeben und die Mischung einige Zeit auf dem Wasserbad erwärmt. Nach dem Abkühlen bringt man den ausgeschiedenen Kupferkomplex durch Zugabe von 1500 ml Methanol und 50 ml 2N NaOH in Lösung. Nun werden auf einmal 50 ml Benzylbromid hinzugefügt und das Gemisch bei 25° C eine Stunde lang stark gerührt. Das ausgefallene O-Benzyl-tyrosin-Cu wiegt nach dem Absaugen und Waschen mit CH_3OH/H_2O (1:3,5) 80 g.
Der Kupferkomplex wird nun mit 1N HCl zerstört, abgesaugt, gut mit Wasser, verdünnter Ammoniaklösung und Aceton/Äther gewaschen. Man kristallisiert mehrmals aus Methanol um und erhält farblose Kristalle.

Ausbeute: 54 g (48,1 % d.Th.)
Schmp.: 221-224° C Lit.Schmp. 223° C [96]

$[\alpha]_D^{20}$ = -9,3 (c=1,8/AcOH) Lit. $[\alpha]_D^{20}$ = 9,9 (c=1,8/AcOH) [96]

R_F-Werte: B = 0,73
MG: 271,32 $C_{16}H_{17}O_3N$

Elementaranalyse:	C	H	N
ber.:	64,80	5,4	4,4
gef.:	65,0	5,4	4,6

N^{α}-t-Butyloxycarbonyl-L-benzyltyrosin
(Boc-L-Tyr(OBzl)-OH)

33,8 g (0,12 Mol) O-Benzyl-L-tyrosin [96] werden nach der Methode von E. Schnabel [89] am Autotitrator mit 4N NaOH behandelt.
Ausbeute: 63,1 g (68 % d.Th.)
Schmp.: 109° C (EE/PÄ) Lit.Schmp.: 108-109° C (EE/PÄ) [89]

$[\alpha]_D^{20}$ = + 11 (HOAc) Lit. $[\alpha]_D^{20}$ = + 12° (HOAc)

R_F-Werte: D = 0,42
MG: 371,43 $C_{21}H_{25}O_5N$

Elementaranalyse:	C	H	N
ber.:	68,0	6,75	3,77
gef.:	67,99	6,78	3,60

3.3. N^{α}-t-Butyloxycarbonyl-L-methionin (Boc-L-Met-OH) [89]

37,3 g Methionin (0,15 Mol) werden in einem Gemisch von Dioxan/Wasser aufgeschlemmt, 23,6 g Boc-Azid hinzugefügt und für 15 - 20 Stunden bei einem pH 9,4 mit 4N NaOH umgesetzt. Man erhält ein leicht gelb gefärbtes Öl.
Ausbeute: 56,07 g (90% d.Th.)
MG 249,2 $C_{10}H_{19}O_4NS$

Elementaranalyse:	C	H	N	S
ber.:	48,18	7,68	5,6	12,7
gef.:	48,15	7,74	4,9	11,89

N^{α}-t-Butyloxycarbonyl-L-methionin-Dicyclohexylammoniumsalz

Boc-Methionin wird in Äther gelöst. Dann gibt man eine äquivalente Menge Dicyclohexylamin hinzu, filtriert, wäscht mit absolutem Äther und trocknet.

Ausbeute: 58,05 g (90 % d.Th.)

Schmp.: 137-138° C Lit.Schmp. 138-139° C [89]

$[\alpha]_D^{20}$ = + 12,9 (c=1, MeOH) Lit. $[\alpha]_D^{20}$ = + 13,2 (c=1, MeOH) [89]

MG: 430,52 $C_{22}H_{42}O_4N_2S$

Elementaranalyse:	C	H	N	S
ber.:	61,36	9,83	6,51	
gef.:	61,83	10,02	6,71	

Wiedergewinnung von Boc-L-Methionin:

Man erhält Boc-L-Met nach Suspendieren des DCHA-Salzes in Wasser, Abkühlen auf 0° C und Ansäuern mit 2N Zitronensäure auf pH 4 als Öl zurück. Dieses Öl wird in Essigsäureäthylester aufgenommen und die wässrige Phase 2 mal mit EE extrahiert. Die Essigester-Phasen werden vereinigt, mit Wasser, $NaHCO_3$-Lösung und nochmals mit Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen wird das Lösungsmittel abgezogen und das Boc-L-Met kann zur Synthese verwendet werden.

3.4. N^{α}-t-Butyloxycarbonyl-L-glutaminsäure-γ-benzylester (Boc-L-Glu(Bzl)-OH) [97,98]

a) H-Glu(OBzl)-OH

10 ml konzentrierte H_2SO_4 gibt man langsam unter kräftigem Rühren zu 100 ml absolutem Äther und fügt anschließend 100 ml frisch destillierten Benzylalkohol hinzu. Nach einigem Rühren zieht man den Äther am Wasserstrahlvakuum ab. In die verbleibende Lösung gibt man 14,17 g (0,1 Mol) fein gepulverte Glutaminsäure. Man läßt 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen und versetzt dann mit 200 ml 95 %-igem Äthanol. Nun tropft man unter heftigem Rühren 50 ml Pyridin hinzu, kühlt über Nacht im Kühlschrank und saugt das ausgefallene Produkt ab. Man wäscht mit Äther und kristallisiert aus heißem Wasser um.

Ausbeute: 14,69 g (62 % d.Th.)

Schmp.: 187° C Lit.Schmp.: 169-170° C

$[\alpha]_D^{20}$ = + 17,5 (c=2, HOAc) Lit. $[\alpha]_D^{20}$ = + 18,7 (c= 7,16, HOAc)

R_F-Werte: D = 0,40

MG: 237,26 $C_{12}H_{15}O_4N$

Elementaranalyse:	C	H	N
ber.:	60,8	6,4	5,9
gef.:	60,38	6,31	6,21

b) Boc-L-Glu(OBzl)-OH [89]

13 g (0,054 Mol) Glutaminsäure-γ-benzylester werden nach der pH-Stat-Methode von E. Schnabel [89] in 100 ml Dioxan/Wasser (1:1) suspendiert, mit 8,49 g (0,06 Mol) Boc-Azid versetzt und am Autotitrator bei pH 9,1 mit 4N NaOH titriert. Die Reaktionszeit beträgt 36 Stunden. Dann wird das überschüssige Boc-Azid ausgeäthert, die H_2O-Phase auf pH 3 eingestellt und das Produkt mit EE extrahiert. Es wird über Na_2SO_4 getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel

abgezogen. Man erhält ein farbloses Öl.
Ausbeute: 13,2 g (72 % d.Th.)

$[\alpha]_D^{20}$ = 4,9 (c=1, MeOH) Lit. $[\alpha]_D^{20}$ = -5,2 (c=1, MeOH) [89]

R_F-Werte: A = 0,72; B = 0,79; D = 0,44
MG: 337,29 $C_{17}H_{23}O_6N$

3.5. N^{α}-N^{im}-t-Butyloxycarbonyl-L-histidin (Bis-Boc-L-His-OH) [99,100]

Zur Darstellung von Bis-Boc-L-histidin werden zwei verschiedene Synthesemöglichkeiten angewandt.

a) 15,5 g (0,1 Mol) freies Histidin werden in 20 ml 50%-igem Dioxan aufgeschlemmt, mit 28,6 g (0,2 Mol) Boc-Azid versetzt und bei 45° C drei Stunden lang gekühlt. Während dieser Zeit hält man den pH mit 4N NaOH zwischen pH 9 - 9,5 unter gleichzeitiger Zugabe von 40 ml Dioxan. Hierauf läßt man den pH bei Zugabe von 7,15 g (0,05 Mol) Boc-Azid auf 8,2 ansteigen. Während der nächsten drei Stunden werden Boc-Azid (0,15 Mol ≙ 21,45 g) und Dioxan (20 ml) bei pH 8 - 8,4 hinzugegeben. Dann zieht man das Dioxan am Rotationsverdampfer ab, mischt den Rückstand mit 150 ml Wasser und wäscht 2 mal mit je 150 ml Äthern. Nun kühlt man die Lösung auf 0° C ab und bringt den pH mit 3N HCl auf pH 3. Man extraniert mit 150 ml Portionen Essigester, wäscht die vereinigten Essigesterphasen 3 mal mit 50 ml gesättigter NaCl-Lösung, anschließend mit Wasser und trocknet über $MgSO_4$. Man erhält ein leicht gelb gefärbtes Öl.
Ausbeute: 10,9 g Öl (30,8 % d.Th.) [99]
R_F-Werte: A = 0,83; D = 0,45
MG: 355,3 $C_{16}H_{25}O_6N_3$

b) 13,2 g freies Histidin (0,085 Mol) werden in 500 ml Dimethylsulfoxid und 60 ml Triäthylamin suspendiert. Zu dieser Suspension gibt man 60 ml (0,42 Mol) Boc-Azid. Diese Mischung wird so lange gerührt, bis sie klar ist. Die folgende Aufarbeitung wird bei 4° C durchgeführt. Nach Zugabe von 1,8 l H_2O wird die Lösung zweimal mit je 400 ml Äther gewaschen. Die wässrige Phase wird gekühlt, mit 2N HCl auf pH 2,5 eingestellt und dann zweimal mit je 400 ml Essigsäureäthylester extrahiert. Die Essigesterphasen werden mit Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Es wird über $MgSO_4$ bei Zimmertemperatur getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel abgezogen.
Ausbeute: 19,10 g (64 % d.Th.) [100]
R_F-Werte: A = 0,86; B = 0,88; D = 0,40
MG: 355,3 $C_{16}H_{25}O_6N_3$

In beiden Fällen wird das Dicyclohexylammoniumsalz hergestellt. Hierzu wird das erhaltene Öl in 120 ml Chloroform gelöst, auf 0° C abgekühlt, mit 24 ml Dicyclohexylamin und 600 ml Petroläther versetzt. Das DCHA-Salz kristallisiert bei 4° C aus [100].
Ausbeute: 28,6 g (67% d.Th.)
Schmp.: 154-157° C Lit.Schmp.: 155-158° C
$[\alpha]_D^{20}$ = + 16,4 (c=1, $CHCl_3$) Lit. $[\alpha]_D^{20}$ = + 16,9 (c=1, $CHCl_3$)
R_F-Werte: A = 0,83; D = 0,45
MG: 536,7 $C_{28}H_{48}O_6N_4$

Elementaranalyse:	C	H	N
ber.:	62,66	9,01	10,4
gef.:	61,98	8,98	10,35

3.6. N^{α}-t-Butyloxycarbonyl-L-phenylalanin (Boc-L-Phe-OH) [89]

41,35 g L-Phenylalanin (0,25 Mol) werden mit 39,3 g (0,275 Mol) Boc-Azid am Autotitrator bei pH = 10,1 13 1/2 Stunden behandelt. Nach der üblichen Aufarbeitung erhält man ein gelblich gefärbtes Öl, das sich aus Diisopropyläther/Petroläther gut kristallisieren läßt.
Ausbeute: 53,6 g (81 % d.Th.)
Schmp.: 85 - 88° C Lit.Schmp.: 85 - 87° C [89]

$[\alpha]_D^{20}$ = -3,3 (c=1, 14 HOAc) Lit. $[\alpha]_D^{20}$ = -4 (c=1, HOAc)

R_F-Werte: D = 0,65
MG: 265,31 $C_{14}H_{19}O_4N$

Elementaranalyse:	C	H	N
ber.:	63,4	7,17	5,28
gef.:	64,88	7,51	5,40

3.7. N^{α}-t-Butyloxycarbonyl-L-nitroarginin (Boc-L-Arg(NO_2)-OH) [89]

a) H-L-Arg(NO_2)-OH

Im Falle des L-Arginins liegt eine Diaminocarbonsäure vor. Deshalb schützt man vor der Umsetzung derartiger Aminosäuren nach Schnabel [89] mit Boc-Azid die zweite noch vorhandene Aminogruppe anderweitig. In dieser Arbeit wird hierzu die Nitrogruppe benutzt.
Zur Herstellung der Nitriersäure legt man 40 ml rauchende Salpetersäure vor und fügt unter Kühlung im Eisbad und starkem Rühren 25 ml rauchende H_2SO_4 und 15 ml konzentrierte H_2SO_4 hinzu. Nun gibt man langsam in einem Zeitraum von etwa 4 Stunden 30 g (0,17 Mol) L-Arginin hinzu und rührt noch eine weitere Stunde bei -10° C. Nun wird die klare Lösung im Methanol/Trockeneisbad abgekühlt und un-

gefähr 150 g zerstückeltes Eis hinzugegeben. Beim langsamen Erwärmen der Lösung entwickeln sich nitrose Gase und die Lösung bekommt eine leichte Grünfärbung. Mit konzentriertem Ammoniak wird nun unter Eiskühlung auf pH 8-9 und danach mit Eisessig auf pH 6 eingestellt. Bei 5° C läßt man über Nacht stehen und saugt dann das leicht braun gefärbte Reaktionsprodukt ab.

Ausbeute: 28 g (74 % d.Th.)

Schmp.: 255 - 258° C Lit.Schmp.: 261° C [36]

$[\alpha]_D^{20}$ = +23,9 (c=1,2 N HCl) Lit. $[\alpha]_D^{20}$ = +24,3 (c=1,2 N HCl) [36]

R_F-Werte: A = 0,25

MG: 219,14 $C_6H_{13}O_4N_5$

Elementaranalyse:	C	H	N
ber.:	32,88	6,38	31,83
gef.:	32,66	6,24	31,73

b) N^{α}-t-Butyloxycarbonyl-L-nitroarginin (Boc-L-Arg(NO_2)-OH [89]

21,92 g (0,1 Mol) L-Nitroarginin werden in 40 ml Dioxan/Wasser (1:1) suspendiert. Zu dieser Suspension gibt man 15,73 g (0,11 Mol, 10 % Überschuß) Boc-Azid und titriert bei pH 9,8 24 Stunden lang mit 4 N NaOH. Man arbeitet wie üblich auf und fällt das Boc-L-Arg(NO_2)-OH aus Essigester/Petroläther.

Ausbeute: 28,7 g (84 %) Lit. 30,05 g (88 % d.Th.)

Schmp.: 121 - 125° C Lit.Schmp.: 115 - 116° C [89]
123 - 125° C (EE)

$[\alpha]_D^{20}$ = -5 (c=1, DMF) Lit. $[\alpha]_D^{20}$ = -5,6 (c=1, DMF)

R_F-Werte: D = 0,33

MG: 341,35 $C_{11}H_{22}O_6N_5$

Elementaranalyse:	C	H	N
ber.:	43,42	7,28	23,01
gef.:	43,59	7,25	23,21

3.8. N^{α}-t-Butyloxycarbonyl-L-tryptophan (Boc-L-Trp-OH) [89]

Auch Boc-L-Trp-OH wird nach der pH-Stat-Methode von E. Schnabel erhalten. Bei der Umkristallisation mit Essigester/Petroläther erhält man weiße Nadeln. Es werden 10 g (0,049 Mol) L-Tryptophan eingesetzt.

Ausbeute: 12 g (80,6 % d.Th.

Schmp.: 134 - 138° C — Lit.Schmp.: 136,5 - 140,5° C [37]

Lit.Schmp.: 135 - 137° C [101]

$[\alpha]_D^{20}$ = -19,8 (c=1, HOAc) — Lit. $[\alpha]_D^{20}$ = -21,5 (c=1, HOAc) [101]

Lit. $[\alpha]_D^{20}$ = -18,2 (c=1, HOAc) [102]

R_F-Werte: D = 0,43

MG: 304,35 — $C_{16}H_{20}O_4N_2$

Elementaranalyse:	C	H	N
ber.:	63,14	6,62	9,20
gef.:	63,25	6,94	8,85

3.9. N^{α}-t-Butyloxycarbonyl-glycin (Boc-Gly-OH) [89]

20 g (0,27 Mol) Glycin werden 2,5 Stunden mit 42,9 g (0,3 Mol) Boc-Azid und 4N NaOH umgesetzt. Aufgearbeitet wird wie oben beschrieben.

Ausbeute: 40,5 g (87 % d.Th.) Lit.: 41,9 g (90 % d.Th.)

Schmp.: 85 - 87° C — Lit.Schmp.: 85 - 89° C [35]

Lit.Schmp.: 94 - 95° C [89]

MG: 175,18 — $C_7H_{13}O_4N$

Elementaranalyse:	C	H	N
ber.:	47,99	7,48	8,00
gef.:	48,06	7,52	7,93

4. Darstellung der Aminosäureester, Z-Glu(OtBu)-OCP und Z-Histidin-Azid

4.1. L-Benzyltyrosinmethylester (Hydrochlorid) [103,104] (H-L-Tyr(Bzl)-OMe . HCl)

Zu 10,84 g (0,04 Mol) H-L-Tyr(Bzl)-OH [96] in Methanol werden unter Kühlung in einer Eis/Kochsalz-Mischung langsam 5,7 g (0,47 Mol) Thionylchlorid zugetropft. Anschließend läßt man die Reaktionsmischung 48 Stunden im Kühlschrank stehen, zieht das Lösungsmittel größtenteils am Rotationsverdampfer ab, wiederholt diesen Vorgang mehrmals durch Zugabe von Methanol und fällt schließlich durch Zugabe von Äther.

Ausbeute: 10,41 g (81 % d.Th.)

Schmp.: 181 - 183 ° C Lit.Schmp.: 182 - 186° C

$[\alpha]_D^{20}$ = +11,2 (c=4, MeOH) Lit. $[\alpha]_D^{20}$ = +11,5 (c=4, MeOH)

R_F-Werte: A = 0,35; D = 0,75

MG: 321,81 $C_{17}H_{20}O_3N\,Cl$

Elementaranalyse:	C	H	N
ber.:	63,55	6,23	4,36
gef.:	63,48	6,19	4,39

4.2. L-Benzylserinmethylester (Hydrochlorid) [105] (H-L-Ser(Bzl)-OMe . HCl)

39,04 g (0,2 Mol) O-Benzyl-L-Serin werden in 250 ml absolutem Methanol aufgeschlämmt. Zu dieser Suspension tropft man langsam unter guter Kühlung 15 ml (0,2 Mol) Thionylchlorid hinzu. Anschließend läßt man langsam auf Zimmertemperatur erwärmen und kocht über Nacht unter Rückfluß. Dann wird das Methanol teilweise abgezogen, der Ester in der Kälte mit Äther gefällt, mit Essigester und Äther gut gewaschen und über KOH getrocknet.

Ausbeute: 26,92 g (70 % d.Th.)

Schmp.: 150° C Lit.Schmp.: 148 - 150° C

$[\alpha]_D^{20}$ = -2,5 (c=1, H_2O) Lit. $[\alpha]_D^{20}$ = -2,7 (c=3, H_2O)

R_F-Werte: D = 0,65

MG: 245,71 $C_{11}H_{18}O_3NCl$

Elementaranalyse:	C	H	N
ber.:	53,77	6,56	5,70
gef.:	53,84	6,40	5,74

4.3. L-Methioninmethylester (Hydrochlorid) [103,106]
(H-L-Met-OME . HCl)

14,93 g (0,1 Mol) H-L-Met-OH, 11,90 g (0,1 Mol) $SOCl_2$ und 100 ml Methanol werden wie bei H-L-Tyr(Bzl)-OMe . HCl (4.1.) zur Reaktion gebracht und aufgearbeitet.

Ausbeute: 15,18 g (76 % d.Th.)

Schmp.: 142 - 143° C Lit.Schmp.: 144° C

$[\alpha]_D^{20}$ = +25,9 (c=1, H_2O) Lit. $[\alpha]_D^{20}$ = +26,3 (c=1, H_2O)

R_F-Werte: D = 0,68

MG: 199,70 $C_6H_{14}O_2NSCl$

Elementaranalyse:	C	H	N	S
ber.:	36,09	7,06	7,01	16,05
gef.:	35,98	6,98	7,07	17,46

4.4. L-Histidinmethylester (Hydrochlorid) [107]
(H-L-His-OMe . 2 HCl)

20,4 g (0,13 Mol) freies Histidin werden in 450 ml absolutem Methanol mit 8 ml konzentrierter Schwefelsäure während 30-minütigem Kochen verestert. Anschließend leitet man bis zur Sättigung getrocknetes HCl-Gas ein. Nach Kühlung über Nacht wird abgesaugt und gut mit Petroläther gewaschen.

Ausbeute: 30 g (80,9 %) Lit.: 33 g (89 %)

Schmp.: 200 - 202 ° C Lit.Schmp.: 202° C

$[\alpha]_D^{20}$ = +15,9 (c=1, MeOH) Lit. $[\alpha]_D^{20}$ = +16,4 (c=1, MeOH)

R_F-Werte: A = 0,17; B = 0,78

MG: 242,11 $C_7H_{13}O_2N_3Cl_2$

Elementaranalyse:	C	H	N
ber.:	34,71	5,38	17,35
gef.:	34,63	5,52	17,21

4.5. L-Phenylalaninmethylester, L-Tryptophanmethylester und Glycinmethylester (Hydrochloride) (H-L-Phe-OMe . HCl, H-L-Trp-OMe . HCl und H-Gly-OMe - HCl)

Diese Aminosäuren werden ebenfalls nach den Vorschriften von Brenner und Huber [103] bzw. R.A. Boissonas et al. [104] mit Thionylchlorid in Methanol synthetisiert. Eingesetzt werden:

16,52 g (0,1 Mol) L-Phe-OH
20,4 g (0,1 Mol) L-Trp-OH
7,5 g (0,1 Mol) Gly-OH

L-Phenylalaninmethylester (Hydrochlorid) [104]
(H-L-Phe-OMe . HCl)

Ausbeute: 17,5 g (81 % d.Th.)

Schmp.: 156 ° C Lit.Schmp.: 158 - 160° C

$[\alpha]_D^{20}$ = +12,58 (c=1, H_2O) Lit. $[\alpha]_D^{20}$ = +12,75 (c=1, H_2O)

R_F-Werte: A = 0,84; D = 0,41

MG: 215,68 $C_{10}H_{14}O_2N\,Cl$

Elementaranalyse:	C	H	N	Cl
ber.:	55,67	6,54	6,49	16,43
gef.:	55,65	6,58	6,35	15,89

L-Tryptophanmethylester (Hydrochlorid) [103,104]
(H-L-Trp-OMe . HCl)

Ausbeute: 20,15 g (85 % d.Th.)
Schmp.: 214° C Lit.Schmp.: 216° C [108]
$[\alpha]_D^{20}$ = +17,5 (c=1, MeOH) Lit. $[\alpha]_D^{20}$ = +17,9 (c=1, MeOH)
R_F-Werte: A = 0,35; D = 0,52
MG: 254,72 $C_{12}H_{15}O_2N_2Cl$

Elementaranalyse:	C	H	N	Cl
ber.:	56,58	5,93	11,00	13,92
gef.:	56,54	5,81	11,13	14,13

Glycinmethylester (Hydrochlorid) [103]
(H-Gly-OMe - HCl)

Ausbeute: 10,17 g (81 % d.Th.)
Schmp.: 173° C Lit.Schmp.: 175° C [109]
R_F-Werte: A = 0,18; D = 0,22
MG: 125,53 $C_3H_8O_2N\,Cl$

Elementaranalyse:	C	H	N	Cl
ber.:	28,70	6,42	11,16	28,24
gef.:	28,63	6,27	11,16	28,13

4.6. Benzyloxycarbonyl-glutaminsäure-γ-t-butylester-Trichlorphenylester (Z-Glu(OtBu)OCP)

a) Benzyloxycarbonyl-L-glutaminsäure (Z-L-Glu(OH)-OH)

22,1 g (0,15 Mol) L-Glutaminsäure werden in 40 ml Wasser suspendiert und vorsichtig mit 25,35 g (0,3 Mol) $NaHCO_3$ versetzt. Zu dieser Suspension werden gleichzeitig 25,5 g (0,15 Mol) Z-Chlorid und 2N NaOH zugetropft. Nach beendeter Zugabe von Z-Chlorid wird auf pH = 9 eingestellt und die verbleibende 2N NaOH am pH-Stat zugetropft. Die

Reaktion ist nach etwa 5 Stunden beendet, der Gesamtverbrauch an NaOH beträgt etwa 200 ml. Dann wird mit 2N H_2SO_4 auf pH 2 eingestellt, 3 mal mit Essigester extrahiert und über Na_2SO_4 getrocknet. Anschließend wird das Lösungsmittel abgezogen und das verbleibende Öl in der Kälte auskristallisiert. Man kristallisiert aus Essigester/Petroläther um.
Ausbeute: 34 g (80,5 % d.Th.)
Schmp.: 115 - 117° C Lit.Schmp.: 120 - 122° C [110]
$[\alpha]_D^{20}$ = -7,5 (c=2, HOAc) Lit. $[\alpha]_D^{20}$ = -7,9 (c=10, HOAc)
R_F-Werte: A = 0,52
MG: 280,27 $C_{13}H_{15}O_6N$

Elementaranalyse:	C	H	N
ber.:	55,51	5,38	4,98
gef.:	55,48	5,44	4,88

b) Benzyloxycarbonyl-L-glutaminsäureanhydrid
(Z-L-Glu$\overline{O}$)

34 g (0,12 Mol) Z-L-Glutaminsäure werden in 80 ml Acetanhydrid suspendiert und bei Zimmertemperatur so lange gerührt, bis sich alles gelöst hat. Dann wird das Lösungsmittel bei 40° C abdestilliert, der Rückstand in 30 ml Chloroform gelöst und mit 130 ml absolutem Äther versetzt. Im Kühlschrank kristallisiert das Anhydrid aus.
Ausbeute: 24 g (78 % d.Th.)
Schmp.: 89 - 91° C Lit.Schmp.: 90 - 92° C [111]
$[\alpha]$ = -43,8° (c=2, HAc) Lit. $[\alpha]$ = -45,1° (c=9,98, HOAc)
R_F-Werte: A = 0,65
MG: 263,25 $C_{13}H_{13}O_5N$

Elementaranalyse:	C	H	N
ber.:	59,31	4,98	5,32
gef.:	59,10	5,13	5,37

c) Benzyloxycarbonyl-L-glutaminsäure-γ-methylester-α-Dicyclohexylammoniumsalz
(Z-L-Glu(OH)-OMe . DCHA)

Zu einer Lösung von 24 g (0,09 Mol) Z-L-Glutaminsäureanhydrid in 300 ml absolutem Äther und 134 ml absolutem Methanol werden unter Rühren 21,5 ml Dicyclohexylamin in 34 ml absolutem Äther eingetropft. Nach mehrstündigem Rühren und anschließendem Stehenlassen über Nacht wird das ausgefallene DCHA-Salz abgesaugt, mit Äther gewaschen und getrocknet.

Ausbeute: 20 g (45 % d.Th.)

Schmp.: 170 - 172° C Lit.Schmp.: 171 - 173° C [112)]

$[\alpha]$ = -10,3 (c=1, MeOH) Lit. $[\alpha]$ = -10,6 (c=1, MeOH)

R_F-Werte: A = 0,75; D = 0,86

MG: 462,58 $C_{25}H_{38}O_6N_2$

Elementaranalyse:	C	H	N
ber.:	65,52	8,46	5,88
gef.:	65,35	8,39	5,98

d) Benzyloxycarbonyl-L-glutaminsäure-γ-methylester
(Z-L-Glu(OH)-OMe)

20 g (0,042 Mol) Z-L-Glu-α-OMe-γ-DCHA-Salz werden in 50 ml Essigester suspendiert und mit 13 ml 2,5N HCl in Essigsäureäthylester fünf Stunden lang gerührt. Dann wird der Niederschlag abgesaugt, mit Essigester gewaschen und die Filtrate mehrmals mit Wasser extrahiert. Anschließend trocknet man über Na_2SO_4 und zieht das Lösungsmittel im Vakuum ab. Das erhaltene Öl kristallisiert mit Hilfe von Impfkristallen im Kühlschrank.

Ausbeute: 10,5 g

Schmp.: 62 - 65° C Lit.Schmp.: 64 - 66° C [113)]

R_F-Werte: A = 0,73

MG: 295,29 $C_{14}H_{17}O_6N$

Elementaranalyse:	C	H	N
ber.:	56,94	5,80	4,74
gef.:	56,81	5,73	4,68

e) Benzyloxycarbonyl-L-glutaminsäure-α-methyl-γ-t-butyl-ester (Z-L-Glu(OtBu)-OMe) [113]

10 g (0,034 Mol) Z-L-Glu(OH)-OMe werden in 50 ml absolutem Methylenchlorid gelöst und in einen Kolben gebracht. Danach wird die Lösung auf -15° C abgekühlt und mit 0,5 ml konzentrierter HCl und etwa 40 ml Isobutylen versetzt. Unter gelegentlichem Umschütteln wird der Kolben vier Tage bei Raumtemperatur aufbewahrt. Danach wird das Isobutylen und das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen, der Rückstand in Essigester aufgenommen. Man wäscht mit 5%-iger $NaHCO_3$-Lösung und Wasser und trocknet über Na_2SO_4. Nach dem Abziehen verbleibt ein farbloses, nicht kristallisierbares Öl.
Ausbeute: 10,3 g (87 %)
MG: 351,44 $C_{18}H_{25}O_6N$

Elementaranalyse:	C	H	N
ber.:	61,52	7,17	3,99
gef.:	61,39	7,27	4,10

f) Benzyloxycarbonyl-L-glutaminsäure-γ-t-butylester-DCHA-Salz (Z-L-Glu(OtBu)-OH . DCHA)

10 g (0,0288 Mol) Z-L-Glu(OtBu)-OMe werden in 40 ml Dioxan gelöst und mit 28,8 ml 1N NaOH am Autotitrator bei pH 9 verseift. Anschließend kühlt man und stellt den pH mit 1N HCl auf 7 ein. Hierauf zieht man das Dioxan am Rotationsverdampfer ab, stellt erneut auf pH 9 und extrahiert nicht umgesetzten Diester mit Essigester. Die wässrige Lösung wird mit Äther überschichtet und mit 1N HCl auf pH 1,5 gebracht. Ausgefallener Monoester wird in Äther aufgenommen, die H_2O-Phase mit Äther extrahiert. Die Ätherextrakte werden über Na_2SO_4 getrocknet, abfiltriert, der Äther abgezogen und der Rückstand mit 6 g (0,033 Mol) Dicyclohexylamin in Äther versetzt. Nach Stehenlassen im Kühlschrank wird das Produkt abfiltriert und mit Äther gewaschen.

Ausbeute: 12,7 g (84 % d.Th.)
Schmp.: 136 - 138° C Lit.Schmp.: 139° C [114]
$[\alpha]$ = +9,6° (c=1, EtOH) Lit. $[\alpha]$ = +9,72° (c=2, EtOH)

R_F-Werte: A = 0,74
MG: 423,44 $C_{23}H_{33}O_6N_2$

Elementaranalyse:	C	H	N
ber.:	67,15	8,94	5,40
gef.:	67,03	9,01	5,52

g) Benzyloxycarbonyl-L-glutaminsäure-γ-t-butylester (Z-L-Glu(OtBu)-OH) [113]

12,5 g (0,024 Mol) Z-L-Glu(OtBu)-OH. DCHA werden in 90 ml Äther aufgeschlemmt und unter kräftigem Rühren mit 32 ml 1N H_2SO_4 versetzt. Die Ätherphase wird abgetrennt, mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels verbleibt ein farbloses Öl.
Ausbeute: 6,5 g (73 % d.Th.)
MG: 337,2 $C_{17}H_{23}O_6N$

h) Benzyloxycarbonyl-L-glutaminsäure-γ-t-butylester-trichlorphenylester [115] (Z-L-Glu(OtBu)OCP)

6,3 g Z-Glu(OtBu)-OH (0,0187 Mol) werden in EtOAc gelöst und mit 4,08 g (0,0187 Mol) 2,4,5-Trichlorphenol in EtOAc versetzt. Man gibt 3,86 g (0,0187 Mol) Dicyclohexylcarbodiimid hinzu und rührt 12 Stunden bei 0° C und 30 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wird vom Harnstoff abfiltriert und das Lösungsmittel abgezogen. Man kristallisiert aus Äthanol um.
Ausbeute: 6,45 g (67% d.Th.)
Schmp.: 111 - 113° C Lit.Schmp.: 107 - 108° C [115]

$[\alpha]$ = -19,8 (c=1, DMF) Lit. $[\alpha]$ = -22,1 (c= 5,4, DMF)
MG: 516,88 $C_{23}H_{25}N\ O_6Cl_3$

4.7. Benzyloxycarbonyl-L-histidinhydrazid
(Z-L-His-$NHNH_3$) [116]

15,6 g Histidinmethylester-dihydrochlorid, 124 ml absolutes Chloroform und 173 ml Triäthylamin werden auf 0° C gekühlt und in die Lösung 5,285 g Chlorameisensäurebenzylester eingebracht. Zur gekühlten Lösung werden nach 2 Min. 8,7 ml Triäthylamin hinzugefügt. Nach vollständiger Lösung werden weitere 5,285 g Chlorameisensäurebenzylester zugegeben. Nach 5-minütigem Stehen bei 0° C läßt man die Lösung 30 Minuten bei Raumtemperatur reagieren, wäscht die Chloroformlösung mit H_2O, trocknet mit Na_2SO_4 und zieht das Lösungsmittel vollständig ab. Zum öligen Rückstand wird noch 3 mal 50 ml Äther hinzugefügt und abrotiert. Anschließend wird in 30 ml absolutem Äthanol gelöst und 6,2 ml H_2O-freies Hydrazinhydrat zugetropft. Man läßt bei Raumtemperatur 24 Stunden stehen, kühlt, filtriert das Hydrazid ab und wäscht mit Äther. Anschließend kristallisiert man mehrmals aus heißem Wasser um.

Ausbeute: 10,23 g (55,1% d.Th.) Lit.Ausbeute: 9 g (48,5% d.Th.) [11]
Schmp.: 171 - 172° C Lit.Schmp.: 171 - 173° C
R_F-Werte: A = 0,42; D = 0,47
MG: 303,32 $C_{14}H_{17}O_3N_5$

Elementaranalyse:	C	H	N
ber.:	55,43	5,65	23,19
gef.:	55,27	5,67	23,09

4.8. Benzyloxycarbonyl-L-histidinazid
(Z-L-His-N_3) [118]

9,6 g (0,032 Mol) Z-L-His-NH-NH_3 in 96 ml 1N HCl werden mit 128 ml absolutem Esssigsäureäthylester gemischt und im Eisbad gekühlt. Nun wird eine kalte Lösung von 224 g Natrium-

nitrit gelöst in 8 ml H_2O hinzugegeben. Nach weiteren 2 Minuten fügt man 38,4 ml 50%-ige Kaliumcarbonatlösung hinzu und neutralisiert anschließend. Die Essigsäure-äthylester-Lösung wird abgetrennt und die H_2O-Lösung mit EE extrahiert. Die vereinigten EE-Phasen werden bei 0° C über Na_2SO_4 getrocknet. Die getrocknete Lösung wird dann sogleich für die Kupplung mit L-Phe-OMe . HCl eingesetzt.

III. DARSTELLUNG DER PEPTIDDERIVATE NACH DER KLASSISCHEN METHODE

1. L-Seryl-L-tyrosyl-l-seryl-l-methionin

a) N^{α}-t-Butyloxycarbonyl-L-benzylseryl-L-benzyl-tyrosinmethylester (Boc-L-Ser(OBzl)-L-Tyr(OBzl)-OME)

2,95 g (0,01 Mol) Boc-L-Ser(Bzl)-OH [89] und 3,21 g (0,01 Mol) L-Benzyltyrosin-methylester-hydrochlorid [103,104] werden in 50 ml Dimethylformamid gelöst. Dann fügt man 2,7 g (0,02 Mol) 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) und 2,02 g (0,02 Mol) N-Methylmorpholin hinzu und kühlt die Lösung auf 0° C ab. Dann gibt man eine gekühlte Lösung von 2,06 g (0,01 Mol) Dicyclohexylcarbodiimid (DCCI) in wenig Dimethylformamid (DMF) hinzu. Man läßt eine Stunde bei 0° C und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur rühren. Hierauf filtriert man den gebildeten Dicyclohexylharnstoff (DCH) ab, engt ein und kühlt, um weiteren DCH auszukristallisieren. Anschließend zieht man das Lösungsmittel am Hochvakuum ab, nimmt den öligen Rückstand in Essigsäureäthylester auf, wäscht mehrmals mit gesättigter Natriumbicarbonatlösung, mit Wasser, zu Zitronensäurelösung und wieder mit Wasser. Man trocknet über Na_2SO_4 und fällt aus Methanol/Wasser in der Kälte.

Ausbeute: 4,9 g (89,3 % d.Th.)

Schmp.: 110 - 113° C

$[\alpha]_D^{20}$ = +5,2 (c=1, DMSO)

R_F-Werte: A = 0,94; D = 0,85

MG: 552,67 $C_{32}H_{38}O_7N_2$

Elementaranalyse:	C	H	N
ber.:	68,4	6,65	5,69
gef.:	68,32	6,68	5,79

Aminosäureanalyse:	Ser	Tyr
	1	0,96

b) N^{α}-t-Butyloxycarbonyl-L- benzylseryl-L-benzyltyrosin
(Boc-L-Ser(OBzl)-L-Tyr(OBzl)-OH)

4 g (0,072 Mol) Boc-L-Ser(Bzl)-L-Tyr(Bzl)-OMe werden in wenig Dimethylformamid gelöst und unter Zugabe von 1N NAOH zwei Stunden lang verseift. Anschließend wird mit 1N HCl neutralisiert. Man zieht das Lösungsmittel ab, nimmt das verbleibende Öl in Methanol auf, filtriert vom entstandenen NaCl ab und fällt mit Äther. Anschließend wird das Produkt über Sephadex LH 20 gereinigt.
Ausbeute: 3,1 g (79,5% d.Th.)
Schmp.: 116 - 119° C

$[\alpha]_D^{20}$ = +23,5 (c=1, MeOH)

R_F-Werte: A = 0,93; B = 0,69; D = 0,63
MG: 537,63 $C_{31}H_{37}O_7N_2$

Elementaranalyse:	C	H	N
ber.:	69,6	6,47	5,21
gef.:	68,9	6,67	4,99

Aminosäureanalyse:	Ser	Tyr
	1	0,94

c) N^{α}-t-Butyloxycarbonyl-L- benzylseryl-L-benzyltyrosyl-L-benzylserin-methylester
(Boc-L-Ser(OBzl)-L-Tyr(OBzl)-L-Ser(OBzl)-OMe)

2 g Boc-L-Ser(Bzl)-L-Tyr(Bzl)-OH (0,0036 Mol) und 0,9 g L-Ser(Bzl)-OMe . HCl [105] (0,0036 Mol) werden in einer geringen Menge DMF/MeOH gelöst. Man gibt 0,75 g (0,0075 Mol) N-Methylmorpholin und 1 g (0.0075 Mol) 1-Hydroxybenzotriazol hinzu und kühlt die Lösung auf 0° C ab. Dann gibt man

0,75 g (0,0036 Mol) Dicyclohexylamin hinzu, rührt eine Stunde bei 0° C und 24 Stunden bei Normaltemperatur. Anschließend saugt man den entstandenen Dicyclohexylharnstoff ab und zieht das Lösungsmittel unter mehrmaliger Zugabe von Methanol ab. Das zurückbleibende Produkt wird in EE aufgenommen, mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung, Wasser, 2N Zitronensäure und nochmals Wasser gewaschen. Man trocknet über Na_2SO_4 und fällt aus der Essigesterlösung unter Zugabe von Petroläther.
Ausbeute: 2,39 g (87,2% d.Th.)
Schmp.: 56 - 59° C

$[\alpha]_D^{20}$ = -2,5 (c=1, MeOH)

R_F-Werte: A = 0,89; D = 0,87
MG: 739,87 $C_{42}H_{49}O_9N_3$

Elementaranalyse:	C	H	N
ber.:	68,19	6,67	5,68
gef.:	67,97	6,68	5,79

Aminosäureanalyse:	Ser	Tyr
	1,96	1

d) N^{α}-t-Butyloxycarbonyl-L-benzylseryl-L-benzyltyrosyl-L-benzylserin
(Boc-L-Ser(OBzl)-L-Tyr(OBzl)-L-Ser(OBzl)-OH)

2 g Boc-L-Ser(Bzl)-L-Tyr(Bzl)-L-Ser(Bzl)-OMe (0,0027 Mol) werden mit 1N NaOH in 35 Minuten in methanolischer Lösung verseift und mit 1N HCl neutralisiert. Man engt die Lösung ein, filtriert vom NaCl ab und fällt aus Methanol/Wasser nach der Reinigung über LH 20.
Ausbeute: 1,6 g (83% d.Th.)
Schmp.: ab 95° C Zersetzung

$[\alpha]_D^{20}$ = 3,5 (c = 1, MeOH)

R_F-Werte: A = 0,95; B = 0,78; D = 0,37
MG: 724,85 $C_{41}H_{46}O_9N_3$

Elementaranalyse:	C	H	N
ber.:	68,19	6,67	5,68
gef.:	67,97	6,68	5,79

Aminosäureanalyse:	Ser	Tyr
	1,96	1

e) N^{α}-t-Butyloxycarbonyl-L-benzylseryl-L-benzyltyrosyl-L-benzylseryl-L-methioninmethylester
(Boc-L-Ser(OBzl)-L-Tyr(OBzl)-L-Ser(OBzl)-L-Met-OMe)

2,2 g Boc-L-Ser(Bzl)-L-Tyr(Bzl)-L-Ser(Bzl)-OH (0,00304 Mol), 0,597 g L-Met-OMe . HCl [103,106] (0,00304 Mol), 0,41 g 1-Hydroxybenzotriazol und 0,32 g N-Methylmorpholin werden in Dimethylformamid gelöst und auf 0° C gekühlt. Man fügt 0,62 g DCCI (0,0031 Mol) hinzu, rührt eine Stunde bei 0° C und über Nacht bei Raumtemperatur. Der ausgefallene DCH wird abgesaugt, das DMF unter mehrmaliger Zugabe von Methanol völlig abgezogen, in Essigsäureäthylester gelöst und mit Petroläther gefällt.
Ausbeute: 2 g (83% d.Th.)
Schmp.: 149 - 152° C
$[\alpha]_D^{20}$ = -7,19 (c=1, DMF)
R_F-Werte: A = 0,85; D = 0,74
MG: 871,06 $C_{47}H_{58}O_{10}N_4S$

Elementaranalyse:	C	H	N	S
ber.:	64,80	6,71	6,45	3,68
gef.:	64,72	6,27	6,45	3,73

Aminosäureanalyse:	Ser	Tyr	Met
	1,96	1	0,56

f) N^{α}-t-Butyloxycarbonyl-L- benzylseryl-L-benzyltyrosyl-L-benzylseryl-L-methionin
(Boc-L-Ser(Bzl)-L-Tyr(Bzl)-L-Ser(Bzl)-L-Met-OH)

1,8 g Boc-L-Ser(Bzl)-L-Tyr(Bzl)-L-Ser(Bzl)-L-Met-OMe (0,002 Mol) werden in 50 ml absolutem Methanol gelöst und mit 5 ml 1N HCl versetzt. Man läßt bei Raumtemperatur 60 Minuten rühren. Nach beendeter Verseifung wird mit 1N HCl auf pH 5 angesäuert, das Lösungsmittel abgezogen, in Methanol aufgenommen und vom NaCl abfiltriert. Das verbleibende Öl wurde gleich zur Weiterverarbeitung eingesetzt.

Ausbeute: 1,59 g (90 % d.Th.)

R_F-Werte: D = 0,44

MG: 856,03 $C_{46}H_{55}O_{10}N_4S$

Elementaranalyse:	C	H	N	S
ber.:	64,54	6,48	6,55	3,75
gef.:	64,48	6,55	6,38	3,61

Aminosäureanalyse:	Ser	Tyr	Met
	1,89	1	0,95

g) L-Seryl-L-tyrosyl-L-seryl-L-methionin
(L-Ser-L-Tyr-L-Ser-L-Met-OH)

1,4 g (0,016 Mol) Boc-L-Ser(Bzl)-L-Tyr(Bzl)-L-Ser(Bzl)-L-Met-OH werden in Trifluoressigsäure/Anisol (50:5) gelöst. In diese Lösung wird 60 Minuten lang Bromwasserstoffsäure eingeleitet. Anschließend wird das Lösungsmittel vollständig abgezogen. Das verbleibende Rohprodukt wird dreimal in MeOH/H_2O (1:1) gelöst, wiederum zur Trockne eingeengt und mehrere Male mit je 50 ml absolutem Äther zur Entfernung des Anisols extrahiert. Das in der HBr-Form vorliegende Tetrapeptid wird anschließend mittels eines Ionenaustauschers in die Acetat-Form übergeführt.

Ausbeute: 0,65 g (82,3 % d.Th.)

Schmp.: 208-212° C Lit.Schmp.: 211° C

$[\alpha]$ = -26,4 (c=1, MeOH) Lit. $[\alpha]$ = -29° (MeOH)

MG: 486,54 $C_{20}H_{30}O_8N_4S$

Elementaranalyse:	C	H	N	S
ber.:	49,31	6,22	11,52	6,59
gef.:	48,74	6,17	11,48	6,23

Aminosäureanalyse:	Ser	Tyr	Met
	1,93	1	0,97

2. L-Histidyl-L-phenylalanyl-L-arginyl-L-tryptophanyl-glycin [119,120]

a) N^{α}-t-Butyloxycarbonyl-L-nitroarginyl-L-tryptophan-methylester (Boc-L-Arg(NO_2)-L-Trp-OMe

16 g Boc-L-Arg(NO_2)-OH [89] und 13,2 g L-Trp-OMe . HCl [103,104] (0,068 Mol) werden unter leichtem Erwärmen in Dimethylformamid gelöst. Zu dieser Lösung gibt man 10,8 g HOBt (0,08 Mol) und 8,08 g N-Methylmorpholin (0,08 Mol). Man kühlt auf 0° C ab, fügt eine konzentrierte Lösung von 14,01 g DCCI (0,068 Mol) hinzu, rührt eine Stunde bei 0° C und anschließend 24 Stunden bei Raumtemperatur. Hierauf saugt man den gebildeten Dicyclohexylharnstoff ab, engt zur Trockne ein, nimmt das zurückbleibende Öl in Essigsäure-äthylester auf, wäscht mehrmals mit gesättigter $NaHCO_3$-Lösung Wasser und 2N Citronensäure. Nach dem Trocknen über Na_2SO_4 fällt man aus Essigsäureäthylester unter Einsatz von Petroläther.

Ausbeute: 18,4 g (76 % d.Th.)

Schmp.: 115 - 120° C

$[\alpha]_D^{20}$ = + 1,13 (c = 1, MeOH)

R_F-Werte: A = 0,79; B = 0,95; D = 0,52

MG: 519,66 $C_{23}H_{33}O_7N_7$

Elementaranalyse:	C	H	N
ber.:	53,06	6,42	18,87
gef.:	52,08	6,56	18,75

b) N^{α}-t-Butyloxycarbonyl-L-nitroarginyl-L-tryptophan
(Boc-L-Arg(NO_2)-L-Trp-OH)

16 g Boc-L-Arg(NO_2)-L-Trp-OMe (0,03 Mol) werden in Methanol unter Zusatz von wenig Wasser gelöst und mit 4 ml 1N NaOH innerhalb einer Stunde verseift. Man neutralisiert mit 4 ml 1N HCl und zieht das Lösungsmittel ab. Man nimmt in Essigsäureäthylester auf, filtriert das entstandene Natriumchlorid und wäscht mit Wasser. Es wird über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel wiederum abgezogen und in absolutem Methanol aufgenommen. Bei Zugabe von Äther in der Kälte erhält man ein weißes amorphes Produkt.
Ausbeute: 9,6 g (62 % d.Th.)
Schmp.: ab 165° Zersetzung
$[\alpha]$ = +10,5 (MeOH/c=1)
R_F-Werte: A = 0,85; D = 0,44
MG: 505,53 $C_{22}H_{31}O_7N_7$

Elementaranalyse:	C	H	N
ber.:	52,27	6,18	19,39
gef.:	52,25	6,09	18,98

c) N^{α}-t-Butyloxycarbonyl-L-nitroarginyl-L-tryptophanyl-glycinmethylester [121,122]
(Boc-L-Arg(NO_2)-L-Trp-Gly-OMe)

8,7 g Boc-L-Arg(NO_2)-L-Trp-OH (0,017 Mol) und 3,24 g Boc-Gly-OMe . HCl [103] (0,017 Mol) werden in 50 ml DMF unter Zusatz von wenig Methanol gelöst. Zu dieser Lösung gibt man 2,3 g HOBt (0,017 Mol) und 3,46 g N-Methylmorpholin (0,017 Mol). Unter Kühlung bei 0° C fügt man 3,54 g DCCI (0,017 Mol), gelöst in wenig DMF, hinzu. Man läßt zuerst bei Kühlung und dann über Nacht bei Raumtemperatur rühren.

Man zieht das DMF/Methanol-Gemisch bis zur Trockne ab und nimmt in n-Butanol auf. Man kühlt die n-Butanol-Lösung mehrere Stunden im Kühlschrank ab und filtriert den auskristallisierten Harnstoff ab. Nun wäscht man nach der üblichen eben beschriebenen Methode und fällt nach dem Trocknen aus n-Butanol/Äther. Umkristallisiert wird anschließend aus heißem Essigester.

Ausbeute: 8,24 g (83 % d.Th.)

Schmp.: 108 - 113° C Lit.Schmp.: 112 - 113° C [121,122]

$[\alpha]_D^{20}$ = -12,4 (DMF, c=1) Lit. $[\alpha]_D^{20}$ = -13,6 (DMF, c=1) [121,122]

R_F-Werte: A = 0,84; D = 0,54

MG. 576,61 $C_{25}H_{36}O_8N_8$

Elementaranalyse:	C	H	N
ber.:	52,07	6,29	19,43
gef.:	51,98	6,35	20,01

Aminosäureanalyse:	Arg	Gly
	1	0,9

Die Anwesenheit des L-Tryptophan wurde auf Grund seiner charakteristischen Absorptionsbanden oberhalb 250 mM charakterisiert.

d) L-Nitroarginyl-L-tryptophanyl-L-glycinmethylester-Trifluoracetat
(L-Arg(NO_2)-L-Trp-Gly-OMe . TFA)

8 g Boc-L-Arg(NO_2)-L-Trp-Gly-OMe [121,122] (0,0139 Mol) werden, mit 10% Diäthylphosphit versetzt, in 100 ml Trifluoressigsäure/Methylenchlorid (1:1) gelöst und 20 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wird zur Trockne eingeengt und 4 mal mit Methanol nachextrahiert. Das zurückbleibende Öl wird in Essigester gelöst und durch Zugabe von Petroläther erhält man das Endprodukt in kristalliner Form.

Ausbeute: 5,2 g (66,3 % d.Th.)
Schmp.: ab 120° C (Zersetzung)

$[\alpha]_D^{20}$ = +16,78 (c=0,8; MeOH)

R_F-Werte: A = 0,61; B = 0,76; D = 0,37
MG: 590,50 $C_{22}H_{29}O_8N_8F_3$

Elementaranalyse:	C	H	N	F
ber.:	44,75	4,95	18,98	9,65
gef.:	43,26	5,13	17,45	8,99

Aminosäureanalyse:	Arg	Gly
	1	0,89

e) N^{α}-t-Butyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-nitroarginyl-L-tryptophanyl-glycinmethylester [123]
(Boc-L-Phe-L-Arg(NO_2)-L-Trp-L-Gly-OMe)

5 g L-Arg(NO_2)-L-Trp-Gly-OMe . TFA-Salz (0,0085 Mol) und 3,78 g Boc-L-Phe (0,0085 Mol) [89] werden mit 1,06 g 1-Hydroxybenzotriazol (0,0085 Mol) und 1,42 g N-Methylmorpholin (0,0085 Mol) versetzt, in Dimethylformamid gelöst und auf 0° C abgekühlt. Zu dieser Lösung gibt man 2,14 g DCCI (0,01 Mol), gelöst in einer geringen Menge kaltem DMF. Man rührt erst in der Kälte und dann für längere Zeit bei Raumtemperatur. Der ausgefallene Harnstoff wird abgesaugt, das Lösungsmittel bis zur Trockne abgezogen. Man nimmt in Essigsäureäthylester auf, wäscht mehrmals mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung, Wasser, 2N Citronensäure und wiederum mit Wasser. Nach dem Trocknen über Na_2SO_4 wird aus EE/PA gefällt.
Ausbeute: 3,5 g (56% d.Th.)
Schmp.: 173 - 175° C Lit.Schmp.: 176 - 177° C [123]

$[\alpha]_D^{20}$ = -19,3 (c=1, MeOH) Lit. $[\alpha]_D^{20}$ = -20,4 (c=1, MeOH) [123]

R_F-Werte: A = 0,77; D = 0,61
MG: 724,79 $C_{34}H_{45}O_9N_9$

Elementaranalyse:	C	H	N
ber.:	56,34	6,39	17,39
gef.:	56,49	6,36	17,27

Aminosäureanalyse:	Arg	Gly	Phe
	1	0,9	0,85

f) L-Phenylalanyl-L-nitroarginyl-L-tryptophanyl-glycinmethylester-Trifluoracetat [124]

(L-Phe-L-Arg(NO_2)-L-Trp-Gly-OMe . TFA)

3,3 g Boc-L-Phe-L-Arg(NO_2)-L-Trp-Gly-OMe (0,00455 Mol) werden in 40 ml Trifluoressigsäure/Methylenchlorid (1:1), versetzt mit 4 ml Diäthylphosphit (10%), gelöst und eine halbe Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel abgezogen und mehrmals mit Methanol nachgewaschen. Das Peptid-TFA-Salz wird mit Äther gefällt und mehrmals mit Äther digeriert. Nach dem Absaugen erhält man ein amorphes Pulver.

Ausbeute: 3,08 g (92 % d.Th.)

Schmp.: 115 - 118° C

$[\alpha]$ = -1,38 (c=1, MeOH) Lit. $[\alpha]$ = -1,5 ± 1 (c=1,384, MeOH) [1]

R_F-Werte: D = 0,56

MG: 736,67 $C_{31}H_{37}O_9N_9F_3$

Elementaranalyse:	C	H	N	F
ber.:	50,54	5,06	17,11	7,74
gef.:	50,49	4,98	16,89	6,91

Aminosäureanalyse:	Arg	Gly	Phe
	0,89	1	0,96

Benzyloxycarbonyl-L- histidyl-L-phenylalanyl-L-nitroarginyl-L-tryptophanyl-glycinmethylester [125]

(Z-L-His-L-Phe-L-Arg(NO_2)-L-Trp-Gly-OMe)

Da der Versuch, dieses Pentapeptid durch Kupplung von Bis-Boc-L-His mit L-Phe-L-Arg(NO_2)-L-Trp-Gly-OMe [124] zu synthetisieren, mit sehr schlechten Ausbeuten verlief, wurde

die Strategie geändert, und das Dipeptid Z-His-Phe-OMe [126] über die Azidmethode mit dem Tripeptid L-Arg(NO_2)-L-Trp-Gly-OMe . TFA-Salz gekuppelt.

Benzyloxycarbonyl-L-histidyl-L-phenylalaninmethylester [126]
(Z-L-His-L-Phe-OMe)

Eingesetzt: 12 g Z-L-His-$NHNH_2$ (0,039 Mol) und 9,8 g L-Phe-OMe.
Ausbeute: 12,23 g (68,7% d.Th.)
Schmp.: 154 - 156° C Lit.Schmp.: 157 - 158° C [126]
$[\alpha]$ = -12,1 (c=1, MeOH) Lit.$[\alpha]$ = -11,5 ± 5 (c=1,9 MeOH) [126]
R_F-Werte: D = 0,92; B = 0,94
MG: 449,49 $C_{24}H_{25}N_4O_5$

Elementaranalyse:	C	H	N
ber.:	64,13	5,61	12,47
gef.:	63,98	5,45	12,61

Benzyloxycarbonyl-L-histidyl-L-phenylalanyl-L-nitroarginyl-L-tryptophanyl-glycinmethylester
(Z-L-His-L-Phe-L-Arg(NO_2)-L-Trp-Gly-OMe)

10 g (0,022 Mol) Z-L-His-L-Phe-OH werden über eine DCCI-Kupplung mit 12,99 g (0,022 Mol) TFA-Salz von L-Arg(NO_2)-L-Trp-L-Gly-OMe zum geschützten Pentapeptidderivat gekuppelt.
Ausbeute: 16,83 g (78,3% d.Th.) aus MeOH(H_2O
Schmp.: 173 - 178° C Lit.Schmp.: 176 - 178° C [125]
$[\alpha]$ = -25,6 (c=1, DMF) Lit.$[\alpha]$ = -27,9 (c=3, DMF) [125]
R_F-Werte: D = 0,37; A = 0,73
MG: 922,23 $C_{43}H_{50}N_{12}O_{10} \cdot H_2O$

Elementaranalyse:	C	H	N
ber.:	56,1	5,7	18,2
gef.:	55,4	5,9	17,9

Aminosäureanalyse:	His	Phe	Arg	Gly
	0,96	1,02	0,93	1

L-Histidyl-L-phenylalanyl-L-arginyl-L-tryptophanyl-glycin [127,128]

(L-His-L-Phe-L-Arg-L-Trp-Gly-OH)

5 g (0,0056 Mol) geschütztes Pentapeptid [125] werden mit 1N NaOH verseift und anschließend mit Pd/H_2 innerhalb von 3 Stunden hydriert. Das freie Pentapeptid wird über eine G 10 Säule gereinigt.

Ausbeute: 3,57 g (87% d.Th.)

$[\alpha]$ = -10,9 (c=1; 1HHCl) Lit. $[\alpha]$ = -11,8° (c= 0,9;1NHCl) [127,1

MG: 732,78 $C_{34}H_{40}N_{11}O_7 \cdot 2H_2O$

Elementaranalyse:	C	H	N
ber.:	54,2	6,4	19,3
gef.:	53,9	6,23	19,6

Aminosäureanalyse:	His	Phe	Arg	Gly
	1,03	0,98	0,92	1

Benzyloxycarbonyl-L-glutaminyl-γ-t-butylester-L-histidinmethylester [129]

(Z-L-Glu(OtBu)-L-His-OMe)

3,9 g L-His-OMe . 2HCl (0,016 Mol) [107] und 8,27 g Z-L-Glu(OtBu)-OCP werden in einem Aceton/Dimethylformamid-Gemisch unter Zusatz von 3,23 g N-Methylmorpholin (0,032 Mol) über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird der Rückstand abfiltriert und das Lösungsmittel abgezogen. Das zurückbleibende Öl wird in Essigsäureäthylester aufgenommen, mit $NaHCO_3$, Citronensäure und Wasser mehrmals gewaschen. Nach dem Trocknen mit Na_2SO_4 wird das Dipeptid aus Essigester/Petroläther gefällt.

Ausbeute: 5,94 g (76% d.Th.)

Schmp.: 113 - 115° C Lit.Schmp.: 116° C [129]

$[\alpha]_D^{20}$ = -10,9 (c=1, MeOH) Lit. $[\alpha]_D^{20}$ = -11,4 (c=1,25, MeOH) [129]

R_F-Werte: D = 0,64
MG: 488,53 $C_{24}H_{32}O_7N_4$

Elementaranalyse:	C	H	N
ber.:	59,0	6,60	11,47
gef.:	58,7	6,42	11,31

Aminosäureanalyse:	Glu	His
	1	0,96

Benzyloxycarbonyl-L-glutaminyl- ✓ -t-butylester-L-histidin
(Z-L-Glu(OtBu)-L-His-OH)

5,8 g (0,0119 Mol) Z-Glu(OtBu)-His-OMe [129] werden mit 1N NaOH innerhalb von 2 Stunden verseift und anschließend neutralisiert. Das Lösungsmittel wird abgesaugt, der verbleibende Rückstand in Essigester aufgenommen und vom NaCl abfiltriert. Die Lösung wird mit Na_2SO_4 getrocknet, das Lösungsmittel an der Ölpumpe abgezogen und das Produkt zur weiteren Synthese eingesetzt.

Benzyloxycarbonyl-L-glutaminyl- ✓ -t-butylester-L-histidyl-L-phenylalanyl-L-nitroarginyl-L-tryptophanyl-glycinmethylester [130]
(Z-L-Glu(OtBu)-L-His-L-Phe-L-Arg(NO_2)-L-Trp-Gly-OMe)

3,1 g (6,54 mM) Z-L-Glu(OtBu)-L-His-OH und 5,26 g (6,54 mM) L-Phe-L-Arg(NO_2)-L-Trp-Gly-OMe . TFA-Salz [124] werden mit 0,67 g (13,08 mM) Methylmorpholin und 0,89 g (6,54 mM) Hydroxybenzotriazol in DMF gelöst und auf 0° C abgekühlt. Zu dieser Lösung werden 1,36 g (6,54 mM) Dicyclohexycarbodiimid - gelöst in Dimethylformamid - hinzugegeben und die Lösung 2 Stunden bei 0° C und anschließend bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird der gebildete Dicyclohexylharnstoff abgesaugt, das Lösungsmittel abgezogen. Das zurückbleibende Öl wird in das 10-fache Volumen Wasser gegossen, und unter Rühren kristallisierte das Produkt.

Das geschützte Hexapeptid wurde abfiltriert und getrocknet.

Ausbeute: 5,58 g (69,8% d.Th.) Lit.: 4,84 (68% d.Th.)

Schmp.: 175 - 178° C Lit.Schmp.: 174 - 177° C

$[\alpha]$ = -29,1 (c=1, MeOH) Lit.$[\alpha]$ = -30,9 (c=1, MeOH)

R_F-Werte: A = 0,62

MG: 1080,19 $C_{52}H_{65}N_{13}O_{13} \cdot H_2O$

Elementaranalyse:	C	H	N
ber.:	56,85	6,14	16,58
gef.:	57,01	6,03	16,44

Aminosäureanalyse:	Glu	His	Phe	Arg	Trp	Gly
	1,04	1,06	0,97	0,92	-	1

L-Glutaminyl- -γ-t-butylester-L- histidyl-L-phenylalanyl-L-arginyl-L-tryptophanyl-glycin [131]

(L-Glu(OtBu)-L-His-L-Phe-L-Arg-L-Trp-Gly-OH)

5,4 g Z-Glu(OtBu)-L-His-L-Phe-L-Arg(NO_2)-L-Trp-Gly-OMe [130] werden in Dimethylformamid gelöst und mit 1N NaOH verseift. Nach der Neutralisation mit 1N HCl erhält man 4,90 g (91,9% d.Th.) Öl mit einem R_F-Wert im Fließmittel A = 0,39. Das Öl wird nun einer katalytischen Hydrierung in Methanol mit ein paar Tropfen Eisessig unterzogen und man erhält das Hexapeptid L-Glu(OtBu)-His-L-Phe-L-Arg-L-Trp-L-Gly-OH [131]

Ausbeute: 4,77 g (89,7% d.Th.)

Schmp.: 214° C zersetzt Lit.Schmp.: 210° C [131]

$[\alpha]$ = -25,7 (c=1, DMF) Lit.$[\alpha]$ = -26,8 (c=2,14, DMF) [131]

MG: 1066,63 $C_{51}H_{63}N_{13}O_{13}$

Elementaranalyse:	C	H	N
ber.:	56,03	6,09	16,66
gef.:	51,12	6,43	16,46

Aminosäureanalyse:	Glu	His	Phe	Arg	Trp	Gly
	1,07	1,03	0,92	0,94	-	1

L-Seryl-L-tyrosyl-L-seryl-L-methionyl-L-glutaminyl-L-histidyl-L-phenylalanyl-L-arginyl-L-trytophanyl-glycin [132]

(L-Ser-L-Tyr-L-Ser-L-Met-L-Glu-L-His-L-Phe-L-Arg-L-Trp-Gly-OH)

2 g (0,0023 Mol) Boc-L-Ser(Bzl)-L-Tyr(Bzl)-L-Ser(Bzl)-L-Met-OMe werden in 50 ml absolutem Methanol aufgeschlemmt und mit einem Überschuß an Hydrazinhydrat versetzt. Diese Lösung läßt man über Nacht bei Raumtemperatur stehen, zieht mehrmals mit Methanol ab und trocknet das gebildete Hydrazid im Vakuum. Dieses Hydrazid wird nach der üblichen Reaktion mit dem Hexapeptid L-Glu(OtBu)-L-His-L-Phe-L-Arg-L-Trp-Gly-OH [131] über eine Azidkupplung zum teilweise geschützten Decapeptid gekuppelt. Anschließend werden nach den bekannten Reinigungsschritten die noch vorhandenen Schutzgruppen (Benzyl- und tert.Butyl-Gruppe) mit Trifluoressigsäure abgespalten. Zur Bestimmung der physikalisch-chemischen Daten wird das Peptid einer ionenaustausch-chromatographischen Trennung unterworfen.

Ausbeute: 2,07 g (69,3% d.Th.) Rohprodukt

Schmp.: 203° C Lit.Schmp.: 192 - 194° C Acetatform [132]

$[\alpha]$ = -27,9 (c=1; 1NHOAc) Lit. $[\alpha]$ = -30 (c=1, HOAc)

MG: 1300,41 $C_{59}H_{77}N_{16}O_{16}S$

Elementaranalyse:	C	H	N	S
ber.:	54,94	5,97	17,23	2,47
gef.:	54,78	5,85	17,14	2,38

Aminosäureanalyse:

Ser	Tyr	Met	Glu	His	Phe	Arg	Trp	Gly
1,94	0,98	0,75	0,93	0,86	1	1,04	-	1

IV. DARSTELLUNG DER PEPTIDDERIVATE NACH DER MERRIFIELD-METHODE [8,9]

1. L-Seryl-L-tyrosyl-L-seryl-L-methionin [133]
(L-Ser-L-Tyr-L-Ser-L-Met-OH)

1.1. Veresterung von N^{α}-t-Butyloxycarbonyl-L-methionin mit dem Harz [59]

4 g chlormethyliertes Trägerharz (4,16 mM) werden mit 1,53 g (6,1 mM) Boc-L-Methionin, 0,9 ml Triäthylamin (4,16 mM) und 50 ml absolutem Äthanol 40 Stunden unter Rückfluß gekocht. Anschließend wird mehrmals mit Äthanol, Methanol, Wasser und Methylenchlorid gewaschen und über Phosphorpentoxid im Hochvakuum getrocknet.
Zur Bestimmung der Beladung des Harzes mit der ersten Aminosäure werden 10 mg Boc-L-Met-Harz 24 Stunden mit 6N HCl im Vakuum bei 110° C hydrolysiert. Die Lösung wird vom verbleibenden Polymer abfiltriert, die Salzsäure am Rotationsverdampfer abgezogen, der Rückstand mehrmals mit Wasser gewaschen und erneut zur Trockne eingedampft.

Anschließend wird eine Aminosäureanalyse durchgeführt.
Beladung: 0,24 mM Methionin/g Harz

1.2. Synthese des Tetrapeptids

Zur Synthese bringt man das mit der ersten Aminosäure beladene Harz in das Reaktionsgefäß, das mit einer Schüttelapparatur verbunden ist. Hierdurch wird eine gute Durchmischung der Reagenzien gewährleistet und gleichzeitig eine Zerstörung des Harzes durch zu starke mechanische Einwirkung verhindert.

Synthesezyklus:

Operation	Reagens	Menge (ml/mg)	Zeit (min)	Lösungsmittel (ml)
Waschen	CH_2Cl_2	1x30	10	30
	EtOH	2x30	10	60
	MeOH	1x30	10	30
	CH_2Cl_2	2x40	15	80
Boc-Abspaltung	TFA/CH_2Cl_2	je 10 ml	30	20
Waschen	CH_2Cl_2	1x30	5	30
	EtOH	2x30	15	60
	CH_2Cl_2	1x40	15	40
Neutralisieren	CH_2Cl_2	1x10	20	10
	TÄA	1x20		20
Waschen	CH_2Cl_2	1x30	5	30
	EtOH	2x30	5	60
	CH_2Cl_2	3.20	5	60
Kupplung	Aminosäure	1 1/2-facher Überschuß		2x60
	DMF	10		
	DCCI	1 1/2-facher Überschuß		
	CH_2Cl_2	10		
Waschen	CH_2Cl_2	2x30	5	60
	EtOH	1x30	5	30
	CH_2Cl_2	2x30	5	60

Nach diesem Schema werden nun die restlichen drei Aminosäuren aneinandergekuppelt. Je nach der eingesetzten Aminosäure wird das Lösungsmittel variiert.

1.3. Überprüfung der Synthese

Nach jedem Syntheseschritt wird eine geringe Menge Harz dem Reaktionsgefäß entnommen, getrocknet und einer Aminosäureanalyse unterworfen.

Einwaage	Sequenz	gef. Aminosäure
10 mg	Boc-L-Ser-L-Met-Pol	Met, Ser
10 mg	Boc-L-Tyr-L-Ser-L-Met-Pol	Met, Ser, Tyr
10 mg	Boc-L-Ser-L-Tyr-L-Ser-L-Met-Pol	Met, Ser, Tyr

1.4. Abspaltung des Peptids vom Harz [134)]

4,45 g beladenes Harz werden in Trifluoressigsäure aufgeschlemmt und in diese Lösung vorgetrockneter Bromwasserstoff eingeleitet. Nach 30 Minuten wird vom Harz abfiltriert, mehrmals mit Trifluoressigsäure nachgewaschen und das Lösungsmittel abgezogen. Das Tetrapeptid-HBr-Salz wird in Wasser aufgenommen und zur Entfernung von Bromwasserstoff mit Ionenaustauscher behandelt.
Ausbeute: 320,89 mg Rohprodukt
(68,7% bezogen auf verestertes Methionin)

1.5. Trennung und Reinigung des Rohprodukts

300 mg des eingesetzten Rohproduktes werden wie im allgemeinen Teil S. 68 beschrieben durch Chromatographie getrennt und gereinigt.
Ausbeute: 107,4 mg (35,8 %)
Schmp.: 208° C Lit.Schmp.: 211° C

$[\alpha]$: -27,1 (c=1,2 MeOH) Lit. $[\alpha]$: -29° (MeOH)
MG: 486,55 $C_{20}H_{30}N_4O_8S$

Elementaranalyse:	C	H	N	S
ber.:	49,31	6,22	11,52	6,59
gef.:	48,29	6,35	11,48	6,13

Aminosäureanalyse:	Ser	Tyr	Met
	1,89	1	0,98

2. L-Histidyl-L-phenylalanyl-L-arginyl-L-tryptophanyl-glycin [119,120]

(L-His-L-Phe-L-Arg-L-Trp-Gly-OH)

2.1. Veresterung von N^{α}-t-Butyloxycarbonyl-glycin mit dem Träger

Je 10 g chlormethyliertes Harz (2% quervernetzt, 5% Chlor) werden nach folgenden zwei Methoden mit Boc-Gly-OH beladen [59,60]:

a) 10 g Trägerharz (10,40 mM) werden mit 2,73 g (15,6 mM) Boc-Glycin-OH, 3,6 ml Triäthylamin und 100 ml absolutem Äthanol 40 Stunden unter Rückfluß gekocht. Nach Waschen mit Methylenchlorid, Wasser, Methanol und wiederum Methylenchlorid wird das Harz getrocknet. 10 mg werden 24 Stunden bei 110° C mit 6N HCl hydrolysiert und nach der üblichen Methode die Beladung des Harzes bestimmt [59].
Beladung: 0,24 mM Glycin/g Harz

b) 10 g Harz werden mit 1,75 g (10 mM) Boc-Gly-OH, 0,9 g 9 mM) Triäthylamin und 60 ml Dimethylformamid 24 Stunden in einer leicht verschlossenen Schüttelente geschüttelt. Anschließend wird der Träger getrocknet und mit DMF, Äthanol, Eisessig, Äthanol und Methylenchlorid (300 ml je g Harz) gewaschen.

10 mg beladenes Harz werden in 6N HCl/Dioxan hydrolysiert und die Beladung bestimmt [60].
Beladung: 0,26 mM Glycin/g Harz

2.2. Synthese des Pentapeptides

Das Pentapeptid Boc-L-His-L-Phe-L-Arg(NO_2)-L-Trp-Gly-Pol wird nach dem im allgemeinen Teil gezeigten Syntheseschema (s. S. 20) und dem gleichen Zyklus wie beim Tetrapeptid (s. S. 119) synthetisiert.
Es werden 10 g beladenes Harz eingesetzt und nach jedem Kupplungsschritt wird eine Aminosäureanalyse durchgeführt, um die Kupplung zu überprüfen.

2.3. Abspaltung des Peptids vom Harz [134,135]

5 g beladenes Harz werden in 30 ml Trifluoressigsäure aufgenommen und mit 3 ml Anisol zum Schutze des Tryptophans versetzt. Hierauf leitet man einen durch Schwefelsäure getrockenten Strom von Bromwasserstoff in die Reaktionsmischung. Nach 60 Minuten filtriert man vom Harz ab, wäscht mehrmals mit Trifluoressigsäure nach und zieht das Lösungsmittel ab. Anschließend digeriert man mehrmals mit Äther, um das Anisol zu entfernen.
Ausbeute: 771,2 mg Rohprodukt
(74,3% bezogen auf verestertes Glycin)

2.4. Trennung und Reinigung des Rohproduktes

500 mg des bei der Abspaltung erhaltenen Rohproduktes werden, wie im allgemeinen Teil (s. S. 70) beschrieben, durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie getrennt und gereinigt. Von den einzelnen Fraktionen werden Aminosäureanalysen durchgeführt und die Ausbeute an gesuchtem Pentapeptid bestimmt.

Ausbeute: 0,608 g Rohprodukt (58,7 % d.Th.)

$[\alpha]$ = -11,5 (c=1, 1N HCl) Lit. $[\alpha]$ = -11,8 (c=0,9; 1N HCl)

R_F-Werte: D = 0,38

MG: 798,39 $C_{36}H_{47}N_{11}O_8 2H_2O$

Elementaranalyse:	C	H	N
ber.:	51,85	6,65	18,48
gef.:	51,62	6,48	18,13

Aminosäureanalyse:	His	Phe	Arg	Trp	Gly
	0,98	1,02	0,92	--	1

3. L-Seryl-L-tyrosyl-L-seryl-L-methionyl-L-glutaminyl-L-histidyl-L-phenylalanyl-L-arginyl-L-tryptophanyl-glycin [132]

(L-Ser-L-Tyr-L-Ser-L-Met-L-Glu-L-His-L-Phe-L-Arg-L-Trp-Gly-OH)

3.1. Veresterung von Boc-Gly-OH mit dem Harz

10 g Harz werden nach A. Marglin [60] mit 1,75 g (10 mM) Boc-Gly-OH, 0,9 g (9 mM) Triäthylamin und 60 ml Dimethylformamid 24 Stunden geschüttelt. Nach dem Waschen mit DMF, Äthanol, Eisessig, Äthanol und Methylenchlorid ergab die anschließende Aminosäureanalyse eine Beladung von 0,25 mM Glycin/g Harz.

3.2. Synthese des Decapeptids

Das Decapeptid Boc-L-Ser(Bzl)-L-Tyr(Bzl)-L-Ser(Bzl)-L-Met-L-Glu(Bzl)-L-HIs-L-Phe-L-Arg(NO_2)-L-Trp-Gly-Pol [136] wird nach dem im allgemeinen Teil S. 19 gezeigten Reaktionsschema aufgebaut. Eine Änderung des Reaktionszyklus gegenüber den anderen Merrifield-Peptiden trat insofern auf, als jede Aminosäure nicht einmal für 2 Stunden,

sondern zweimal je 1 Stunde unter Zugabe neuer Reagenzien gekuppelt wurde.
Auch bei dieser Synthese wurde nach jeder Kupplung eine Probe entnommen, hydrolysiert und eine Aminosäureanalyse durchgeführt.

3.3. Abspaltung des Peptids vom Harz [134,137,138]

a) mit HBr/Trifluoressigsäure [134]

5 g Peptid-Harz werden in einer Mischung von Trifluoressigsäure/Anisol (10:1) aufgeschlemmt. In diese Mischung läßt man einen durch TFA/Anisol [135] geleiteten Bromwasserstoff-Strom einströmen. Nach 1 1/2 Stunden wird vom Harz abgesaugt, 2 mal mit je 30 ml Trifluoressigsäure nachgewaschen und die Peptidlösung am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeengt. Um überschüssiges HBr zu entfernen wird das Peptid mehrere Male in Methanol/Wasser (1:1) gelöst und das Lösungsmittel wieder abgezogen. Zur Entfernung des Anisols wird das getrocknete Rohprodukt mehrmals mit Äther extrahiert.
Ausbeute: 1,77 g Nitropeptid
(68,3% bezogen auf verestertes Glycin)

b) mit Fluorwasserstoff [139]

5 g getrocknetes Boc-L-Ser(Bzl)-L-Tyr(Bzl)-L-Ser(Bzl)-L-Met-L-Glu(Bzl)-L-His-L-Phe-L-Arg(NO_2)-L-Trp-Gly-Pol werden in ein Teflon-Reaktionsgefäß gegeben und 10 ml Anisol hinzugefügt. In ein Vorratsgefäß werden ein Magnetrührer und ein paar Gramm Kobalttrifluorid gegeben. Nun wird Fluorwasserstoff - unter Kühlung mit flüssiger Luft - in das Vorratsgefäß destilliert. Hierauf läßt man das Vorratsgefäß sich langsam auf Raumtemperatur erwärmen und destilliert den Fluorwasserstoff in das Reaktionsgefäß. Durch die Anwesenheit von Anisol und HF färbt sich die Lösung rot.

Nach einer Stunde läßt man sich die Lösung erwärmen und bläst den Fluorwasserstoff mit Stickstoff ab. Das trockene Produkt wird in Essigsäureäthylester aufgenommen und zur Entfernung des Anisols mehrmals mit EE gewaschen. Man engt erneut zur Trockene ein, nimmt in Wasser auf und reinigt über eine Ionenaustauschersäule. Hierauf wird erneut zur Trockene eingeengt, der Rückstand in wenig Methanol aufgenommen und das Peptid mit Aceton gefällt.

Ausbeute: 0,92 g Rohprodukt (57,3 % d.Th.)

Schmp.: 190 - 194° C Lit.Schmp.: 192 - 194° C

$[\alpha]$: -28,4° (c=1, 10% HOAc) Lit. $[\alpha]$: -29,2° (c=0,4)

R_f-Werte: A = 0,34

MG: 1300,41 $C_{59}H_{77}N_{16}O_{16}S$

Elementaranalyse:	C	H	N	S
ber.:	54,94	5,97	17,23	2,47
gef.:	54,39	6,07	17,45	2,79

Aminosäureanalyse:

Ser	Tyr	Met	Glu	His	Phe	Arg	Gly
1,93	1,0	0,89	0,94	0,9	1,01	0,95	1

D. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war der Vergleich von ACTH-Teilsequenzen, dargestellt nach der klassischen und der Merrifield-Methode, unter Anwendung der Hochdruckflüssigkeitschromatographie. Nach der Synthese und Reinigung der Peptide ergaben sich auf Grund der physikalisch-chemischen Daten nach beiden Synthesemöglichkeiten einheitliche Hauptprodukte. Es stellte sich nun die Frage über Vor- und Nachteile des jeweiligen Syntheseweges.

Ein Vergleich der Produkte miteinander ergab bei den Festphasenprodukten zwar einen höheren Anteil an Nebenprodukten gegenüber den klassischen Peptiden und hiermit einen geringeren Prozentsatz an gewünschtem Hauptprodukt, andererseits aber lag der Zeit- und Kostenaufwand bedeutend niedriger. Da mittels der Hochdruckflüssigkeitschromatographie eine gute Trennmöglichkeit besteht, ist für die Art der Synthesewahl ihr Ziel entscheidend. Soll ein Peptid möglichst schnell synthetisiert werden, würde ich die Merrifield-Methode bevorzugen, legt man Wert auf gute Ausbeuten, die klassische Methode. Am besten ist wohl eine Kombination beider Methoden, da bei der klassischen Methode mit zunehmender Kettenlänge Schwierigkeiten in der Löslichkeit auftreten, die sich bei der Festphasenmethode nicht ergeben.

E. LITERATURVERZEICHNIS

1. P. Karlson, Biochemie, G. Thieme Verlag Stuttgart
2. P.H. Bell. J.Amer.Chem.Soc. 76, 5565 (1954)
3. R. Geiger, Angew.Chemie 83, 155 (1971)
4. H.D. Jakubke, H. Jeschkeit, Aminosäuren, Peptide, Proteine, Akademie-Verlag, Berlin
5. R. Schwyzer und P. Sieber, Helv.Chim.Acta 49, 134 (1965)
6. Bajusz et al. Acta chim.Acad.Sci.Hung. 30, 239 (1962)
7. B. Riniker, P. Sieber, W. Rittel und H. Zuber, Nature (London) New Biol., 235, 114 (1972)
8. R.B. Merrifield, J.Amer.Chem.Soc. 85, 2149 (1963)
9. G.R. Marschall u. R.B. Merrifield, Biochemistry 4, 2396 (1965)
10. L. Weisbecker in W.D. Keidel, Kurzgefaßtes Lehrbuch der Physiologie, 197 ff, G. Thieme-Verlag, Stuttgart, 3. Aufl., 1973
11. P. Karlson, Dtsch.med.WSchr. 86, 688 (1961)
12. P. Karlson und C.E. Sekaris, Acta Endocrin. 53, 505 (1966)
13. Jacob und Monod, Mol.Biol. 3, 318 (1961)
14. G. Schultz, Klin.WSchr. 49, 1049 (1971)
15. V. du Vigneaud, G. Rassler, J.M. Swan, G.W. Robert und P.G. Katsoyannis, J.Amer.Chem.Soc. 76, 3115 (1954)
16. Th. Curtius, Chem.Ber. 35, 3226 (1902)
17. D.S. Kemp, Peptides 1971, North Holl.Publ.Comp.
18. M. Bergmann und L. Zervas, J.Biol.Chem. 113, 341 (1936)
19. M.A. Nymann und R.M. Herbst, J.Org.Chem. 15, 108 (1950)
20. Th. Wieland und H. Bernhard, Liebigs Ann.Chem. 572, 190 (1951)
21. R.A. Boissonnas, Helv.Chim.Acta 34, 874 (1951)
22. F. Weygand, P. Huber und K. Weiss, Z.Naturforsch. 22b, 1084 (1967)
23. H. Hagenmaier und H. Frank, Hoppe-Seyler's Z.Physiol. Chem. 353, 1973 (1972)

24. Th. Wieland, W. Schäfer und E. Bokelmann, Liebigs Ann. Chem. 573, 99 (1951)
25. M. Bodanszky, M. Szelke, E. Tomorkeny und E. Weisz, Chem. and Ind. (London) 1517 (1955)
26. J. Pless und R.A. Boissonnas, Helv.Chim.Acta 46, 1609 (1963)
27. J.G. Sheehan und G.P. Hess, J.Am.Chem.Soc. 77, 1067 (1955)
28. J.C. Sheehan, M. Goodman und G.P. Hess, J.Am.Chem.Soc. 78, 1367 (1956)
29. J. Rebek und D. Feitler, J.Am.Chem.Soc. 95, 4052 (1973)
30. J. Rebek, J.Am.Chem.Soc. 96, 1606 (1974)
31. F. Weygand, D. Hoffmann und E. Wünsch, Z.Naturforsch. 21b, 426 (1966)
32. W. König und R. Geiger, Chem.Ber. 103, 788 (1970)
33. M. Bergmann und L. Zervas, Ber.dtsch.chem.Ges. 65, 1192 (1932)
34. L.A. Carpino, J.Am.Chem.Soc. 79, 4427 (1957)
35. F.G. McKay und N.F. Albertson, J.Am.Chem.Soc. 79, 4686 (1957)
36. G.W. Andersson und A.C. Mc Gregor, J.Am.Chem.Soc. 79, 6180 (1957)
37. R. Schwyzer, P. Sieber und H. Kappeler, Helv.Chim. Acta 42, 2622 (1959)
38. J. Meierhofer, J.Am.Chem.Soc. 92, 3771 (1970)
39. R.G. Hiskey und Mitarb., J.Org.Chem. 36, 488 (1971)
40. M. Bremer und W. Huber, Helv.Chim.Acta 36, 1109 (1953)
41. V. du Vigneaud, L.F. Audrieth und H.S. Loring, J.Am. Chem.Soc. 52, 4500 (1930)
42. K. Okawa, Bull.Chem.Soc.Jap. 30, 110 (1957)
43. C.H. Li, D. Yamashiro, S. Lemaire, Biochemistry 14, 953 (1975)
44. Dissertation, Buis, Nymwegen 1973
45. E. Wünsch, Z.Naturforsch. 22b, 1269 (1967)
46. E. Wünsch, G. Wendlberger und R. Spangenberg, Chem. Ber. 104, 3854 (1971)

47. B. Helferich und Mitarbeiter, Chem.Ber. 58, 872 (1925)
48. J. Ramachandran und C.H. Li, J.Org.Chem. 27, 4006 (1962)
49. M. Bergmann, L. Zervas und H. Rinke, Helv.Chim.Acta 224, 40 (1934)
50. G. Jäger und R. Geiger, Chem.Ber. 103, 1727 (1970)
51. M. Fujino, S. Shinagawa, O. Nishimura und T. Fukuda, Chem.Pharm.Bull. 20, 1017 (1972)
52. E. Wünsch, Angew.Chem. 83, 773 (1971)
53. E. Bayer, H. Eckstein, K. Hägele, W.A. König, W. Brüning, H. Hagenmaier und W. Parr, J.Am.Chem.Soc. 92, 1735 (1970)
54. E. Bayer, W.A. König, J.Chrom. Science 7, 95 (1969)
55. H. Frank, Dissertation, Tübingen 1973
56. W. Parr und K. Grohmann, Tetrahedron Letters 28, 2633 (1971)
57. M. Mutter, H. Hagenmaier und E. Bayer, Angew.Chem. 83, 883 (1971)
58. E. Bayer und M. Mutter, Nature 237, 512 (1972)
59. H. Grüb, Dissertation, Tübingen 1971
60. A. Marglin, Tetrahedron Letters 33, 3145 (1971)
61. R. Schwyzer und W. Rittel, Helv.Chim.Acta 44, 159 (1961)
62. E. Wünsch, Z.Naturforsch. 22b, 607 (1967)
63. J.M. Stewart und J.D. Young, Solid Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman and Company, San Francisco 1968
64. K. Medzihradszky und H. Medzikradszky-Schweiger, Acta Chim.Hung. Tomus 44, 15 (1965)
65. H. Medzihradszky-Schweiger und K. Medzikradszky, Acta Chimica Academiae Scientiarum Hungaricae 50, 340 (1966)
66. H. Medzihradszky-Schweiger, Acta Chimica Academiae Scientiarum Hungaricae, Tomus 76, 437 (1973)
67. St. Guttmann und R.A. Boissonas, Helv.Chim. Acta, 41, 1852 (1952)
68. K. Hofmann und Saul Lande, J.Am.Chem.Soc. 83, 2286 (1961)

69. K. Hofmann und Haruaki Yajima, J.Am.Chem.Soc. 83, 2293 (1961)
70. W. Voelter, S. Fuchs, R.H. Seuffer und K. Zech, Monatsh.Chem. 105, 1110 (1974)
71. W. Voelter, K. Zech, C. Bürvenich und S. Fuchs, im Druck
72. R.R. Ernst und W.A. Anderson, Rev.Sci.Instr. 37, 93 (1966)
73. R.R. Ernst und J.S. Wangh, Adv.Magnet.Res. 2, 108 (1977)
74. W. Horsley, H. Sternlicht und J.S. Cohen, J.Am.Chem. Soc. 92, 680 (1970)
75. W. Voelter, G. Jung, E. Breitmaier und E. Bayer, Z.Naturforsch. 26b, 213 (1971)
76. R.G. Parker und J.D. Roberts, J.Org.Chem. 35, 996 (1970)
77. E. Breitmaier, G. Jung und W. Voelter, Angew.Chem. 83. 653 (1971); Angew.Chem.Internat.Ed. 10, 673 (1971)
78. G. Jung, E. Breitmaier, W. Voelter, T. Keller and G. Tänzer, Angew.Chem. 82, 882 (1970)
79. E. Lippmaa und T. Pehk, Eesti NVS Tead.Akad.Toimkeem Geol. 17, 210 (1968)
80. S. Fuchs, Dissertation, Tübingen 1975
81. G. Jung, M. Ottnad, W. Voelter und E. Breitmaier, Z.Anal.Chem. 261, 328 (1972)
82. D.H. Spackman, W.H. Stein and S. Moore, Anal.Chem. 30, 1190 (1958)
83. R.A. Fahmy, A. Niederwieser, G. Pataki und M. Brenner, Helv.Chim.Acta 44, 2022 (1961)
84. A.R. Patton und M. Chism, Ann.Chem. 23, 1683 (1951)
85. F. Reindel und W. Hoppe, Chem.Ber. 87, 1103 (1954)
86. G. Pataki, J.Chromatogr. 12, 541 (1963)
87. G.J. Weber, J.Biol.Chem. 86, 217 (1930)
88. J. Greenstein und A. Winitz, Chemistry of the Amino Acids, Wiley and Sons 1961, S. 890
89. E. Schnabel, Liebigs Ann.Chem. 702 (1967)
90. W. Grassmann, E. Wünsch, P. Deufel und A. Zwick, Chem.Ber. 91 (1958)

91. S.M. Birnbaum et al., J.Biol.Chem. 194, 455 (1952)
92. Hoppe, Seyler, Thierfelder
Handbuch der Physiologischen und Pathologischen chemischen Analyse Bd. III, S. 1670
93. H. Eckstein, Dissertation, Tübingen 1970
94. E. Wünsch und A. Zwick, Chem.Ber. 97, 2497 (1964)
95. H. Otsuko et al., Bl.Chem.Soc.Japan 39, 1171 (1966)
96. E. Wünsch, G. Fries und A. Zwick, Chem.Ber. 91, 542 (1958)
97. Leo Benoiton, Canadian Journal of Chemistry, Vol. 40, 570 (1962)
98. St. Guttmann, R.A. Boissonnas, Helv.Chim.Acta 199, 1852 (1958)
99. D. Yamashiro, J. Blake und C.H. Li, J.Am.Chem.Soc. 94, 2855 (1972)
100. C.H. Li, D. Yamashiro, S. Lemaire, Biochemistry 14, 953 (1975)
101. A.V. Schally, A.J. Kastin und A. Arimura, Fertility and Sterility 22, 703 (1971)
102. R. Burgus, M. Butcher, H. Ling, M. Monaham, J. Rivier, R. Tellows, M. Amoss, R. Blackwell, W. Vale and R. Guillemin, C.R.Acad.Sci. (Paris) D 273, 1611 (1971)
103. E. Wünsch, G. Fries und A. Zwick, Chem.Ber. 91, 542 (1958)
104. J. Ramachandran und C.H. Li, J.Org.Chem. 28, 173 (1963)
105. Okawa, Bull.Chem.Soc.Japan 30, 976 (1957)
106. M. Brenner und W. Huber, Helv.Chim.Acta 36, 1109 (1953)
107. N.C. Devis, J.Biol.Chem. 223, 935 (1956)
108. Boissonnas, St. Guttmann, P.A. Jaquenoud und J.P. Waller, Helv.Chim.Acta 38, 1491 (1955)
109. T. Curtius und F. Gaebel, J.prakt.Chem. 37, 150 (1888)
110. S. Goldschmidt und G. Jutz, Chem.Ber. 86, 1116 (1953)
111. W.J. Le Quesne und G.T. Young, J.Chem.Soc. (London) 1950, 1954 und 1959

112. H. Gibian und E. Klieger, Ann.Chem. 640, 145 (1961)
113. E. Klieger und H. Gibian, Ann.Chem. 655, 195 (1963)
114. E. Taschner et al., Ann.Chem. 646, 127 (1961)
115. J.G. Anderson, G.W. Kenner et al., Tetrahedron Suppl.8, 39 (196
116. W. Holley und Ernest Sondheimer, J.Am.Chem.Soc. 76, 1326 (1954)
117. A. Patchornik, A. Berger und E. Katcholski, J.Am. Chem.Soc. 79, 6416 (1957)
118. P. Sieber et al., Helv.Chim.Acta 53, 2135 (1970)
119. Ken Inouye, Bull.Chem.Soc. Japan 38, 1156 (1965)
120. K. Hofmann und S. Lande, J.Am.Chem.Soc. 83, 2291 (1961)
121. Fujino, M., Nishimura, O. und Hatanaka, C., Chem.Pharm.Bull. 17, 2135 (1969)
122. W. König und R. Geiger, Chem.Ber. 103, 788 (1970)
123. K. Inouye, H. Tanaka and H. Tosuka, Bull.Chem.Soc. Japan 43, 1163 (1970)
124. Ken Inouye, Bull.Chem.Soc. Japan 38, 1153 (1965)
125. K. Hofmann, R. Andreatta, H. Bohn und L. Moreder, 7. Med.Chem. 13, 339 (1970)
126. M.B. North und G.T. Young, Chemistry and Industry, 1955, 1597
127. St. Guttmann und R.A. Boissonnas, Helv.Chim.Acta 199, 1872 (1958)
128. K. Hofmann et al., J.Am.Chem.Soc. 80, 1486 (1958)
129. F. Schneider, Helv.Chim.Acta 320, 82 (1961)
130. R. Schwyzer und H. Kappeler, Helv.Chim.Acta 44, 1991 (1961)
131. H. Kappeler und R. Schwyzer, Helv.Chim.Acta, 44. 1136, 1991 (1961)
132. H. Kappeler und R. Schwyzer, Experientia 16, 415 (1960)
133. R. Schwyzer, A. Costopanagiotis und P. Sieber, Helv.Chim.Acta, 46, 870 (1963)
134. John M. Stewart und Janis D. Young, Solid Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman and Company, 1969, 40

135. R.S. Feinberg und R.B. Merrifield, J.Am.Chem.Soc. 97, 3485 (1975)
136. R. Schwyzer und H. Kappeler, Helv.Chim.Acta 44, 1997 (1961)
137. E. Schröder, Ann.Chem. 670, 127 (1963)

138. John M. Stewart und Janis D. Young, Solid Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman and Company, 1969, 61
139. J. Lenard und A.B. Robinson, J.Am.Chem.Soc. 89, 181 (1967)

LEBENSLAUF

02.02.1942	geboren in Oppeln
Herbst 1948	Volksschule
Herbst 1953	Oberrealschule
Herbst 1964	Abitur
Ab WS 64/65	Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Studienfach Biochemie
Ab WS 66/67	Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Studienfach Chemie
14.4.1969	Vordiplom Chemie
15.7.1972	Diplom Chemie
Diplomarbeit:	Festphasensynthese eines Oktapeptides mit der natürlichen Sequenz 19 bis 26 des Bienengiftes Melittin. Borsäure als Komplexverschiebungsreagens für ^{13}C-NMR-Untersuchungen von Kohlenhydraten, unter der Anleitung von Prof. Dr. W. Voelter.

Meine Ausbildung verdanke ich den Hochschullehrern:

D. Babel, E. Bayer, W. Bues, S. Kemmler-Sack, W.A. König, G. Kortüm, H. Krüger, E. Müller, D. Oelkrug, H. Rau, A. Rieker, W. Rüdorff, W. Schweizer, E. Stumpp, H. Suhr und W. Voelter.

Druck: Polyfoto - Dr. Vogt KG
Forststrasse 58, Tel. 0711/610641
7000 Stuttgart 1

Druck: Polyfoto - Dr. Vogt KG
Forststrasse 58, Tel. 0711/610641
7000 Stuttgart 1